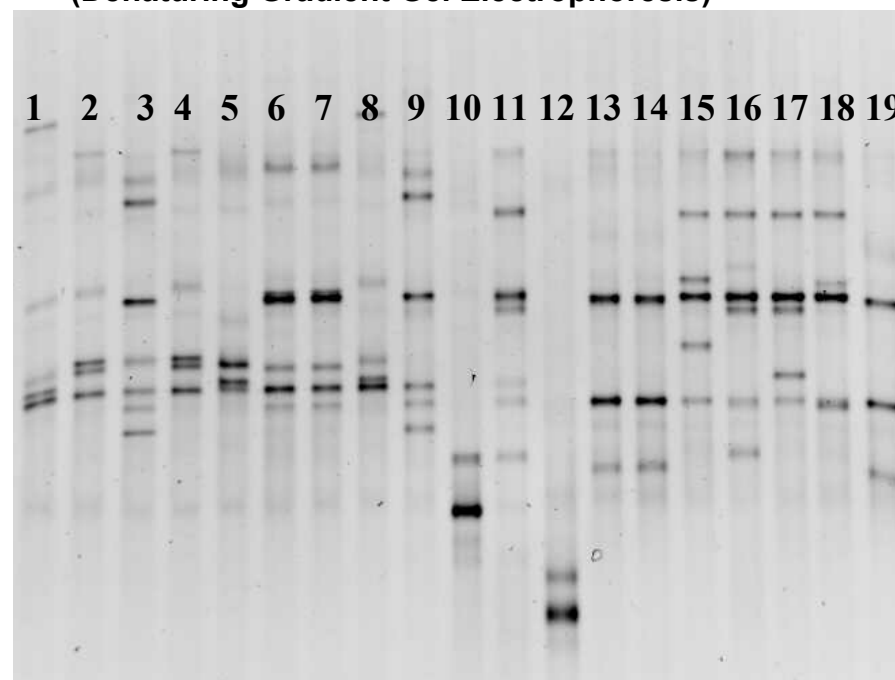


Identificação Molecular e Caracterização da Diversidade de Espécies de Fungos Micorrízicos Arbusculares do Gênero *Gigaspora* por PCR- DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)



Perfis de DGGE de espécies de *Gigaspora*. Da esquerda para a direita: 1. *Gi. albida* BR607A; 2. *Gi. albida* BR601; 3. *Gi. albida* UFLA24; 4. *Gi. albida* CL151; 5. *Gi. albida* FL713; 6. *Gi. albida* INVAM927; 7. *Gi. rosea* FL105; 8. *Gi. candida* BEG17; 9. *Gi. ramisporophora* CNPAB22; 10. *Gi. margarita* CNPAB1; 11. *Gi. gigantea* VA105C; 12. *Gi. gigantea*-like UFLA872; 13. *Gi. gigantea* MN453A-7; 14. *Gi. gigantea* MA453A; 15. *Gi. gigantea* MN414D; 16. *Gi. gigantea* MN922A; 17. *Gi. gigantea* NC110A; 18. *Gi. gigantea* NC150; 19. *Gi. gigantea* CUT.

República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Luis Carlos Guedes Pinto
Presidente

Silvio Crestana
Vice-Presidente

Alexandre Kalil Pires

Ernesto Paterniani

Hélio Tollini

Marcelo Barbosa Saintive
Membros

Diretoria Executiva

Silvio Crestana
Diretor Presidente

Tatiana Deane de Abreu Sá

José Geraldo Eugênio de França

Kepler Euclides Filho

Diretores Executivos

Embrapa Agrobiologia

José Ivo Baldani
Chefe Geral

Eduardo Francia Carneiro Campello
Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Rosângela Stralio
Chefe Adjunto Administrativo



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

ISSN 1676-6709

Março/2005

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 06

**Identificação Molecular e Caracterização da
Diversidade de Espécies de Fungos Micorrízicos
Arbusculares do Gênero *Gigaspora* por PCR-
DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)**

Francisco Adriano de Souza

Seropédica – RJ

2005

Exemplares desta publicação podem ser adquiridas na:

Embrapa Agrobiologia

BR465 – km 7

Caixa Postal 74505

23851-970 – Seropédica/RJ, Brasil

Telefone: (0xx21) 2682-1500

Fax: (0xx21) 2682-1230

Home page: www.cnpab.embrapa.br

e-mail: sac@cnpab.embrapa.br

Comitê Local de Publicações: Eduardo F. C. Campello (Presidente)
José Guilherme Marinho Guerra
Maria Cristina Prata Neves
Verônica Massena Reis
Robert Michael Boddey
Maria Elizabeth Fernandes Correia
Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

Expediente:

Revisores e/ou ad hoc: Jean L. Simões Araújo e Norma Gouvea Rumjanek

Normalização Bibliográfica: Dorimar dos Santos Félix

Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia

1ª impressão (2005): 50 exemplares

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SMINSKI, J. J.; WHITE, T. J. (Ed.). **PCR Protocols, a guide to methods and applications**. San Diego: Academic, 1990. p. 315-322.

YOKOYAMA, K.; TATEISHI, T.; MARUMOTO, T.; SAITO, M. A molecular marker diagnostic of a specific isolate of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 212, p. 171-175, 2002.

D467i De Souza, Francisco Adriano.

Identificação Molecular e Caracterização da Diversidade de Espécies de Fungos Micorrízicos Arbusculares do Gênero *Gigaspora* por PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2005. 51 p. (Embrapa Agrobiologia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 6).

ISSN 1676-6709

1. Biologia molecular. 2. Micorriza vesicular arbuscular. I. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). II. Título. III. Série.

CDD 572.8

© Embrapa 2005

SIMON, L.; LALONDE, M.; BRUNS, T. D. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, p. 291-295, 1992.

SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal symbiosis**. 2. ed. London: Academic, 1997. 605 p.

SWOFFORD, D. L. PAUP*. **Phylogenetic Analysis Using Parsimony** (*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 2003.

TANG, J.; TOE, L.; BACK, C.; UNNASCH, T. R. Intraspecific heterogeneity of the rDNA internal transcribed spacer in the *Simulium damnosum* (Diptera: Simuliidae) complex. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 13, p. 244-252, 1996.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p. 4876-4882, 1997.

TROUVELOT, S.; VAN TUINEN, D.; HIJRI, M.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Visualization of ribosomal DNA loci in spore interphasic nucleic of glomalean fungi by fluorescence in situ hybridization. **Mycorrhiza**, New York, v. 8, p. 203-206, 1999.

VAN DER HEIJDEN, M. G. A.; KLIRONOMOS, J. N.; URSIC, M.; MOUTOGLIS, P.; STREITWOLF, E. R.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A.; SANDERS, I. R. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. **Nature**, London, v. 396, p. 69-72, 1998.

VAN TUINEN, D.; JACQUOT, E.; ZHAO, B.; GOLLOTTE, A.; GIANINAZZI-PEARSON, V. Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 7, p. 879-887, 1998.

SUMÁRIO

Resumo.....	04
Abstract.....	05
Introdução.....	06
Metodologia.....	10
Estirpes de fungos MA avaliadas	10
Amostras de solo	11
Extração e preparação de esporos para análise de DNA	11
Experimento teste de PCR para verificar a especificidade dos "primers" para a família <i>Gigasporaceae</i>	12
Experimento de casa-de-vegetação	12
Extração de DNA de esporos, raízes e amostras de solo.....	13
Amplificação de DNA de esporos utilizando um PCR em "nested"	17
PCR utilizando primers específicos para análise de comunidades de fungos MA da família <i>Gigasporaceae</i>	17
Análise de DGGE.....	18
Teste de reprodutibilidade	19
Seqüenciamento de DNA a partir da recuperação de DNA de bandas de géis de DGGE.....	20
Clonagem do rDNA de fungos MA	20
Seleção de clones via PCR-DGGE e seqüenciamento de DNA	21
Alinhamento de seqüências.....	22
Número de acesso no EMBL das seqüências de nucleotídeos obtidas neste projeto	22
Resultados	22
Perfis de DGGE obtidos da região V3-V4 do 18S rDNA.....	22
Perfis de DGGE obtidos da região V9 do 18S rDNA.....	24
Análise das seqüências obtidas dos perfis de bandas do PCR-DGGE	27
Detecção de espécies de <i>Gigasporaceae</i> em amostras de campo	29
Discussão.....	33
PCR-DGGE como ferramenta para caracterização, identificação e detecção de espécies de <i>Gigaspora</i>	33
Comparação entre os resultados obtidos com a amplificação de DNA obtido de um ou de múltiplos esporos e diversidade geográfica das estirpes analisadas	38
Caracterização de espécies de <i>Gigaspora</i> por PCR-DGGE versus outros procedimentos aplicados previamente	39
Implicações da heterogeneidade entre cópias do 18S rDNA em uma mesma espécie (genoma) para estudos de ecologia microbiana molecular e para estudos de genética evolutiva	41
Agradecimentos	43
Referências Bibliográficas	43

Identificação Molecular e Caracterização da Diversidade de Espécies de Fungos Micorrízicos Arbusculares do Gênero *Gigaspora* por PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

Francisco Adriano de Souza¹

Resumo

Fungos micorrízicos arbusculares são importantes para o funcionamento da maioria dos ecossistemas terrestres, apesar disso, a ecologia, genética e evolução destes fungos é pouco conhecida, devido, parcialmente, a dificuldades associadas com a detecção e identificação de espécies. A variação inter- e intra-específica de genes do 18S rRNA de espécies do gênero *Gigaspora* foi avaliada para testar o uso deste marcador para a discriminação de isolados de *Gigaspora* e para a detecção de populações de *Gigasporaceae* em amostras ambientais. A avaliação de 48 isolados de *Gigaspora* por PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) revelou que a região V3-V4 do gene do 18S rRNA não contém variação suficiente para a discriminação entre espécies diferentes de *Gigaspora*. Em contraste com este resultado, os padrões obtidos para a região V9 deste gene possibilitaram a identificação confiável para todas as espécies reconhecidas neste gênero. Além disso, os perfis de PCR-DGGE forneceram subsídio para identificação de possíveis erros de identificação feitos com base na morfologia dos esporos. E puderam ser utilizados para diferenciar alguns isolados geográficos das espécies *G. albida*, *G. gigantea* e *G. margarita*, mas não para *G. rosea*. Com base nos perfis de bandas de DGGE dos genes ribossomais das espécies estudadas, dois agrupamentos ficaram aparentes, um composto por isolados de *G. albida*, *G. candida*, *G. ramisporophora* e *G. rosea* e o outro composto por isolados de *G. decipiens* e *G. margarita*. O estudo individual de bandas de DGGE obtidos para cada isolado, através de clonagem, seleção de clones por DGGE e sequenciamento, confirmou estes agrupamentos e revelou que algumas cópias do gene rRNA são comuns entre espécies diferentes. Das 48 culturas avaliadas, somente duas apresentaram alguma variação entre esporos obtidos da mesma amostra, estas exceções podem estar indicando o co-isolamento de mais de uma espécie ou subespécie nestas culturas. A análise de dois solos agrícolas brasileiros com PCR em "nested" específico para a família *Gigasporaceae* revelou a dominância de *G. margarita* nas amostras.

SANDERS, I. R.; ALT, M.; GROPE, K.; BOLLER, T.; WIEMKEN, A. Identification of ribosomal DNA polymorphisms among and within spores of the Glomales: application to studies on the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. **New Phytologist**, Oxford, v. 130, p. 419-427, 1995.

SANTOS, A. L.; DE SOUZA, F. A.; GUERRA, J. G. M.; BERBARA, R. L. L. Estabelecimento e capacidade infectiva de *Gigaspora margarita* e *Glomus clarum* em solo sob erosão. **Acta Botanica Brasilica**, Brasília, v. 14, p. 127-39, 2000.

SCHÜßLER, A. Glomales SSU rRNA gene diversity. **New Phytologist**, Oxford, v. 144, p. 205-207, 1999.

SCHÜßLER, A.; SCHWARZOTT, D.; WALKER, C. A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. **Mycological Research**, New York, v. 105, p. 1413-1421, 2001.

SCHWARZOTT, D.; WALKER, C.; SCHUSSLER, A. *Glomus*, the largest genus of the arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomales*), is nonmonophyletic. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 21, p. 190-197, 2001.

SEJALON-DELMAS, N.; MAGNIER, A.; DOUDS, D. D.; BÉCARD, G. Cytoplasmic autofluorescence of an arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora gigantea* and nondestructive fungal observations in planta. **Mycologia**, Bronx, v. 90, p. 921-926, 1998.

SHEFFIELD, V. C.; COX, D. R.; LERMAN, L. S.; MYERS, R. M. Attachment of a 40-base pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 86, p. 232-236, 1987.

SIEVERDING, E. **Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems**. Eschborn: GTZ, 1991. 371 p.

¹ Pesquisador da Embrapa Agrobiologia. Rod. BR 465, km 7 – Seropédica/RJ. Cep: 23890-000. E-mail: fdesouza@cnpab.embrapa.br

LANFRANCO, L.; DELPERO, M.; BONFANTE, P. Intrasporal variability of ribosomal sequences in the endomycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, p. 37-45, 1999.

LLOYD-MACGILP, S. A.; CHAMBERS, S. M.; DODD, J. C.; FITTER, A. H.; WALKER, C.; YOUNG, J. P. W. Diversity of the ribosomal internal transcribed spacers within and among isolates of *Glomus mosseae* and related mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, Oxford, v. 133, p. 103-111, 1996.

MUYZER, G.; SMALLA, K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 73, p. 127-141, 1998.

MYERS, R. M.; MANIATIS, T.; LERMAN, L. S. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. **Methods in Enzymology**, San Diego, v. 155, p. 501-527, 1987.

NÜBEL, U.; ENGELN, B.; FELSKE, A.; SNAIDR, J.; WIESHUBER, A.; AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; BACKHAUS, H. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 178, p. 5636-5643, 1996.

REDECKER, D. Specific PCR "primers" to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. **Mycorrhiza**, New York, v. 10, p. 73-80, 2000.

REDECKER, D.; THIERFELDER, H.; WALKER, C.; WERNER, D. Restriction analysis of PCR-amplified internal transcribed spacers of ribosomal DNA as a tool for species identification in different genera of the order *Glomales*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, p. 1756-1761, 1997.

SANDERS, I. R. Ecology and evolution of multigenomic arbuscular mycorrhizal fungi. **American Naturalist**, Illinois, v. 160, p. S128-S141, 2002.

PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Profiling of Inter- and Intraspecies 18S rRNA Gene Sequence Heterogeneity Is an Accurate and Sensitive Method To Assess Species Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi of the Genus *Gigaspora*

Abstract

Despite the importance of arbuscular mycorrhizal fungi in the majority of terrestrial ecosystems, their ecology, genetics, and evolution are poorly understood, partly due to difficulties associated with detecting and identifying species. I explored the inter- and intraspecies variations of the 18S rRNA genes of the genus *Gigaspora* to assess the use of this marker for the discrimination of *Gigaspora* isolates and of *Gigasporaceae* populations from environmental samples. Screening of 48 *Gigaspora* isolates by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) revealed that the V3-V4 region of the 18S rRNA gene contained insufficient variation to discriminate between different *Gigaspora* species. In contrast, the patterns of 18S ribosomal DNA (rDNA) heterogeneity within the V9 region of this marker could be used for reliable identification of all recognized species within this genus. PCR-DGGE patterns provided insight into some putative misidentifications and could be used to differentiate geographic isolates of *G. albida*, *G. gigantea*, and *G. margarita* but not *G. rosea*. Two major clusters were apparent based upon PCR-DGGE ribotype patterns, one containing *G. albida*, *G. candida*, *G. ramisporophora*, and *G. rosea* and the other containing *G. decipiens* and *G. margarita*. Dissection of the DGGE patterns by cloning, DGGE screening, and sequencing confirmed these groupings and revealed that some ribotypes were shared across species boundaries. Of the 48 isolates examined, only two displayed any spore-to-spore variation, and these exceptions may be indicative of coisolation of more than one species or subspecies within these cultures. Two Brazilian agricultural soils were also analyzed with a *Gigasporaceae*-specific nested PCR approach, revealing a dominance of *G. margarita* within this family.

Index terms: Primers, Glomeromycetes, Molecular Ecology, detection, rDNA, intraspecific variability, identification, fungi

Introdução

Fungos micorrízicos arbusculares (MA) formam uma das simbioses mais comuns com plantas (SMITH & READ, 1997) e a importância desta simbiose para a diversidade e produtividade de ecossistemas terrestres naturais e antrópicos está bem estabelecida (SIEVERDING 1991; SMITH & READ, 1997; VAN DER HEIJDEN et al., 1998). Os fungos MA constituem um grupo monofilético (Glomeromycetes), no qual todos os fungos são simbioses obrigatórios (SCHÜßLER et al., 2001). Infelizmente, existe ainda pouco conhecimento sobre a ecologia, a genética e a evolução destes fungos (GIANINAZZI-PERSON et al., 2001; SANDERS 2002). Os principais obstáculos, à pesquisa com fungos MA, são a inabilidade de se conseguir culturas axênicas e a dificuldade na identificação de espécies, principalmente quando elas estão presentes somente na fase vegetativa (micelial). No entanto, a caracterização de fungos MA por técnicas de biologia molecular vem possibilitando obter importantes avanços no conhecimento sobre filogenia (SCHWARZOTT et al., 2001; SCHÜßLER et al., 2001), ecologia (HELGASON et al., 1998; 2002; HUSBAND et al., 2002ab, KOWALCHUK et al., 2002), genética (GIANINAZZI-PERSON et al., 2001; HARRISON 1999) e evolução (GANDOLFI et al., 2003; SANDERS 2002) deste grupo de fungos biotróficos obrigatórios.

Nos estudos de ecologia molecular os genes ribossomais se tornaram os mais utilizados para caracterização dos fungos MA em amostras de campo (CLAPP et al., 2002). Recentemente, várias estratégias baseadas na amplificação de DNA através da técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction - reação em cadeia da polimerase) têm sido desenvolvidas para determinar a diversidade de fungos MA a partir de DNA extraído de esporos, raízes e solo (CLAPP et al., 2002, KOWALCHUK et al., 2002, KJOLLER & ROSENDAHL 2000; BAGO et al., 1998; VAN TUINEN et al., 1998). Trabalhos desenvolvidos com estas estratégias têm possibilitado a descoberta de novos aspectos da diversidade e ecologia destes fungos, através da análise direta do DNA, sem que seja necessário o estabelecimento de culturas armadilha e a identificação de espécies por análises morfológicas, que são processos laboriosos,

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method of growing plants without soil**. Berkeley: Agricultural Experimental Station, 1950. (Circular, 347).

HUSBAND, R.; HERRE, E. A.; TURNER, S. L.; GALLERY, R.; YOUNG, J. P. W. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi and patterns of host association over time and space in a tropical forest. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, p. 2669-2678, 2002a.

HUSBAND, R.; HERRE, E. A.; YOUNG, J. P. W. Temporal variation in the arbuscular mycorrhizal communities colonising seedlings in a tropical forest. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 42, p. 131-136, 2002b.

JANSA, J.; MOZAFAR, A.; ANKEN, T.; RUH, R.; SANDERS, I. R.; FROSSARD, E. Diversity and structure of AMF communities as affected by tillage in a temperate soil. **Mycorrhiza**, New York, v. 12, p. 225-234, 2002.

KJOLLER, R.; ROSENDAHL, S. Detection of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales) in roots by nested PCR and SSCP (Single Stranded Conformation Polymorphism). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 226, p. 189-196, 2000.

KOWALCHUK, G. A.; DE SOUZA, F. A.; VAN VEEN, J. A. Community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with *Ammophila arenaria* in Dutch coastal sand dunes. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 11, p. 571-581, 2002.

KUHN, G.; HIJRI, M.; SANDERS, I. R. Evidence for the evolution of multiple genomes in arbuscular. **Nature**, London, v. 414, p. 745-748, 2001.

LANFRANCO, L.; BIANCIOTTO, V.; LUMINI, E.; SOUZA, M.; MORTON, J. B.; BONFANTE, P. A combined morphological and molecular approach to characterize isolates of arbuscular mycorrhizal fungi in *Gigaspora* (Glomales). **New Phytologist**, Oxford, v. 152, p. 169-179, 2001.

DE SOUZA, F. A.; TRUFEM, S. F. B.; ALMEIDA, D. L. de; SILVA, E. M. R. da; GUERRA, J. G. M. Effect of pre-crops on the inoculum potential of arbuscular mycorrhizal fungi and cassava yield. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v. 34, p. 1913-1923, 1999.

EDWARDS, S. G.; FITTER, A. H.; YOUNG, J. P. W. Quantification of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus mosseae*, within plant roots by competitive polymerase chain reaction. **Mycological Research**, New York, v. 101, p. 1440-1444, 1997.

GANDOLFI, A.; BONILAUDI, P.; ROSSI, V.; MENOZZI, P. Intraindividual and intraspecies variability of ITS1 sequences in ancient asexual *Darwinula stevensoni* (Crustacea: Ostracoda). **Heredity**, London, v.87, p. 449-455, 2001.

GANDOLFI, A.; SANDERS, I. R.; ROSSI, V.; MENOZZI, P. Evidence of recombination in putative ancient asexuals. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 20, p. 754-761, 2003.

GIANINAZZI-PEARSON, V.; VAN TUINEN, D.; DUMAS-GAUDOT, E.; DULIEU, H. Exploring the genome of Glomalean fungi. In: HOCK, B. (Ed.). **The mycota, fungal associations**. Berlin: Springer-Verlag, 2001. p. 3-17.

GIOVANNETTI, M.; MOSSE, B. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. **New Phytologist**, Oxford, v. 84, p. 489-500, 1980.

HARRISON, M. J. Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 50, p. 361-389, 1999.

HELGASON, T.; DANIEL, T. J.; HUSBAND, R.; FITTER, A. H.; YOUNG, T. P. W. Ploughing up the wood-wide web? **Nature**, London, v. 384, p. 431-431, 1998.

HELGASON, T.; MERRYWEATHER, J. W.; DENISON, J.; WILSON, P.; YOUNG, J. P. W.; FITTER, A. H. Selectivity and functional diversity in arbuscular mycorrhizas of co-occurring fungi and plants from a temperate deciduous woodland. **Journal of Ecology**, Oxford, v. 90, p. 371-384, 2002.

demorados e que, em geral, não permitem uma avaliação detalhada da diversidade nos diversos nichos que estes fungos ocorrem. Além disso, a identificação morfológica de esporos é difícil, havendo frequentemente erros de identificação.

Apesar dos avanços obtidos com o uso de técnicas de biologia molecular, as unidades de taxonomia operacional (seqüências de DNA que representam um taxon) obtidas, na maior parte dos trabalhos com fungos MA, tem precisão para identificar as seqüências de DNA ao nível de sub-gênero ou níveis taxonômicos superiores. Assim, pouco progresso tem sido obtido na identificação e caracterização de espécies per se, que ainda são extremamente dependentes da análise morfológica. Sendo que nestes casos, a qualidade dos resultados obtidos está diretamente ligada ao conhecimento taxonômico do técnico que conduziu as análises. Até o momento, poucos estudos utilizaram os genes ribossomais (rDNA) para a identificação de fungos MA ao nível de espécies (BAGO et al., 1998; REDECKER et al., 1997). As maiorias das análises têm sido limitadas à detecção de espécies pré-determinadas (LANFRANCO et al., 2001; VAN TUINEN et al., 1998).

Através de análises moleculares foi descoberto que o genoma de fungos MA pode conter grande heterogeneidade ou polimorfismo entre cópias do rDNA (ANTONIOLLI et al., 2000; CLAPP et al., 1999; KUHN et al., 2001; LANFRANCO et al., 1999; LLOYD-MACGILP et al., 1996; SANDERS et al., 1995). Esta característica não é comum para a maioria dos organismos que, em geral, apresentam cópias idênticas ou quase idênticas destes genes em seus genomas. No entanto, esta característica tem sido relatada também em outros grupos de organismos tais como: bactérias (AMANN et al., 2000; NÜBEL et al., 1996), plantas (BUCKLER et al., 1997), insetos (TANG et al., 1996) e crustáceos (GANDOLFI et al., 2001). Porém, quase nenhum progresso tem sido obtido na interpretação deste polimorfismo, que pode causar superestimativa do número de espécies, quando seqüências de rDNA extraídas do ambiente são analisadas por intermédio de bibliotecas. No entanto, se este polimorfismo for consistente para uma mesma espécie, esta heterogeneidade poderá ser utilizada como uma característica

vantajosas para a geração de perfis de rDNA espécie específicos para identificação e detecção de fungos MA.

Dentre os oito gêneros considerados até o momento na divisão *Glomeromycota*, tem sido demonstrado experimentalmente que espécies de *Gigaspora* contribuem para a nutrição de plantas (BALOTA & LOPES 1996) e são importantes na recomposição ambiental (SANTOS et al., 2000). Vários estudos têm sido dedicados ao aprimoramento das técnicas de identificação de fungos MA do gênero *Gigaspora*. A taxonomia do gênero *Gigaspora* foi revisada recentemente através de dados morfológicos (BENTIVENGA & MORTON 1995), de ácidos graxos (BENTIVENGA & MORTON 1996), de DNA (BAGO et al., 1998) e pela análise conjunta de dados morfológicos e de DNA (LANFRANCO et al., 2001). Dentre as oito espécies de *Gigaspora* descritas até o momento, BENTIVENGA & MORTON (1995) consideram cinco (*Gi. albida*, *Gi. decipiens*, *Gi. gigantea*, *Gi. margarita* e *Gi. rosea*) como sendo válidas pela análise de parâmetros morfológicos. Duas espécies foram consideradas sinônimas de espécies descritas previamente (*Gi. candida* = *Gi. rosea* e *Gi. ramisporophora* = *Gi. margarita*), e uma espécie, *Gi. tuberculata*, foi considerada sinônima da *Scutellospora persica*. Existem poucos caracteres morfológicos úteis para discriminação entre espécies de *Gigaspora*. Além disso, a faixa de variação de caracteres como cor e tamanho de esporos frequentemente se sobrepõem entre espécies deste gênero (BENTIVENGA & MORTON 1995). BAGO et al. (1998) utilizou assinaturas de nucleotídeos presentes na região V9 do 18S rDNA como diagnóstico para identificar espécies de *Gigaspora*. Estes pesquisadores propuseram o agrupamento das espécies de *Gigaspora* em três grupos distintos: o grupo da *Gi. rosea* (*Gi. albida* e *Gi. rosea*; TAWGTG), o grupo da *Gi. gigantea* (*Gi. gigantea*; TGWGTT) e o grupo da *Gi. margarita* (*Gi. decipiens* e *Gi. margarita*; NGAGTG). A análise deles revelou também a ocorrência de polimorfismo entre as cópias do rDNA dentro de um mesmo genoma, ou seja, do DNA extraído de um único indivíduo. Esta heterogeneidade causou o aparecimento de ambigüidades nas seqüências de DNA geradas, as quais foram traduzidas para as assinaturas de nucleotídeos propostas por eles (letras em negrito

BRÜGGEMANN, J.; STEPHEN, J. R.; CHANG, Y. -J.; MACNAUGHTON, S. J.; KOWALCHUK, G. A.; KLINE, E.; WHITE, D. C. Competitive PCR-DGGE analysis of bacterial mixtures: an internal standard and an appraisal of template enumeration accuracy. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 40, p. 111-123, 2000.

BUCKLER, E. S. I.; IPPOLITO, A.; HOLTSFORD, T. P. The evolution of ribosomal DNA: divergent paralogues and phylogenetic implications. **Genetics**, Baltimore, v. 145, p. 821-832, 1997.

CLAPP, J. P.; FITTER, A. H.; YOUNG, J. P. W. Ribosomal small subunit sequence variation within spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Scutellospora* sp. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, p. 915-921, 1999.

CLAPP, J. P.; HELGASON, T.; DANIELL, T. J.; YOUNG, J. P. W. Genetic studies of the structure and diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. In: VAN DER HEIJDEN, M. G. A.; SANDERS, I. R. (Ed.). **Mycorrhizal ecology, ecological studies**. Berlin: Springer-Verlag, 2002. p. 201-224.

DAHLLOF, I.; BAILLIE, H.; KJELLEBERG, S. rpoB-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 3376-3380, 2000.

DE SOUZA, F. A.; BERBARA, R. L. L. Ontogeny of *Glomus clarum* in Ri T-DNA transformed roots. **Mycologia**, Bronx, v. 91, p. 343-350, 1999.

DE SOUZA, F. A.; KOWALCHUK, G. A.; LEEFLANG, P.; VAN VENN, J. A.; SMIT, E. PCR-denaturing gradient gel electrophoresis profiling of inter- and intra-species 18S rRNA gene sequence heterogeneity is an accurate and sensitive method to assess species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi of the genus *Gigaspora*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 1413-1424, 2004.

ANTONIOLLI, Z. I.; SCHACHTMAN, D. P.; OPHEL, K. K.; SMITH, S. E. Variation in rDNA ITS sequences in *Glomus mosseae* and *Gigaspora margarita* spores from a permanent pasture. **Mycological Research**, New York, v. 104, Part 6, p. 708-715, 2000.

BAGO, B.; BENTIVENGA, S. P.; BRENAC, V.; DODD, J. C.; PICHE, Y.; SIMON, L. Molecular analysis of *Gigaspora* (Glomales, *Gigasporaceae*). **New Phytologist**, London, v. 139, p. 581-588, 1998.

BALOTA, E. L.; LOPES, E. S. Introduction of arbuscular mycorrhizal fungi in coffee under field conditions: I. Persistence and interaction with native species. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 20, p. 217-223, 1996.

BENTIVENGA, S. P.; MORTON, J. B. A monograph of the genus *Gigaspora*, incorporating developmental patterns of morphological characters. **Mycologia**, Bronx, v. 87, p. 719-731, 1995.

BENTIVENGA, S. P.; MORTON, J. B. Congruence of fatty acid methyl ester profiles and morphological characters of arbuscular mycorrhizal fungi in *Gigasporaceae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, p. 5659-5662, 1996.

BEVER, J. D.; SCHULTZ, P. A.; PRINGLE, A.; MORTON, J. B. Arbuscular mycorrhizal fungi: More diverse than meets the eye, and the ecological tale of why. **Bioscience**, Washington, v. 51, p. 923-931, 2001.

BIANCIOOTTO, V.; LUMINI, E.; BONFANTE, P.; VANDAMME, P. 'Candidatus *Glomeribacter gigasporarum*' gen. nov., sp. nov., an endosymbiont of arbuscular mycorrhizal fungi. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, England, v. 53, p. 121-124, 2003.

BIANCIOOTTO, V.; LUMINI, E.; LANFRANCO, L.; MINERDI, D.; BONFANTE, P.; PEROTTO, S. Detection and identification of bacterial endosymbionts in arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the family *gigasporaceae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 4503-4509, 2000.

nas assinaturas). LANFRANCO et al. (2001) deu continuidade a caracterização molecular de algumas espécies de *Gigaspora*, propondo "primers" (seqüências iniciadores de oligonucleotídeos para amplificações de DNA por PCR) espécie-específicos. Já YOKOYAMA et al. (2002) desenvolveram "primers" a partir de seqüências de regiões satélite, capazes de amplificar seletivamente alguns isolados de *Gi. margarita*. Assim, apesar dos resultados obtidos, o desenvolvimento de métodos rápidos e confiáveis, para identificação de espécies e caracterização de comunidades de *Gigaspora*, ainda aguardam desenvolvimento. Devido a falta de métodos analíticos, pouco se conhece sobre, diversidade, distribuição, estabelecimento e competição de espécies de *Gigaspora* em condições de campo.

A técnica do PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis - Eletroforese em gel com gradiente de denaturação) foi inicialmente desenvolvida para estudar mutações. Hoje em dia, ela se tornou uma das técnicas mais utilizadas para análise direta da estrutura de comunidades de microrganismos (MUYZER & SMALLA 1998). A separação de moléculas de DNA pelo DGGE é baseada em diferenças na composição das seqüências de DNA que causam alteração no comportamento de abertura da dupla fita de DNA, causando uma redução da mobilidade de fitas de DNA parcialmente abertas durante a eletroforese em gel de poliácridamida contendo gradiente linear crescente de substâncias desnaturantes (uréia e formamida; para maiores detalhes ver MUYZER & SMALLA 1998). Recentemente, PCR-DGGE foi aplicado com sucesso para estudar a estrutura de comunidades de fungos MA associados com *Ammophila arenaria*, que é uma das principais espécies de plantas responsáveis pela estabilização de dunas costeiras em países de clima temperado (KOWALCHUK et al., 2002).

Este boletim é uma adaptação do trabalho publicado por DE SOUZA et al., 2004 em inglês. E tem três objetivos principais: (1) Desenvolver um método rápido e robusto para caracterização e identificação de espécies de *Gigaspora*, com base na análise via PCR-DGGE de regiões variáveis da subunidade menor do gene ribossomal (18S rDNA); (2) Avaliar o nível e a consistência da heterogeneidade do 18S rDNA entre esporos provenientes de uma

mesma cultura, de esporos de diferentes isolados de uma mesma espécie e entre espécies diferentes de *Gigaspora*, bem como, avaliar a aplicação da técnica do PCR-DGGE para o estudo deste fenômeno; (3) Desenvolver e testar “primers” específicos para a família *Gigasporaceae* e adaptar a técnica do PCR-DGGE para estudar a diversidade de espécies de fungos desta família.

Metodologia

Estirpes de Fungos MA avaliadas

As estirpes de fungos MA utilizadas estão listadas na Tabela 1. Estas estirpes foram utilizadas como controle para padronização da técnica do PCR-DGGE, bem como, para testar o nível de discriminação entre espécies e entre isolados geográficos de uma mesma espécie.

Todas as espécies de *Gigaspora* foram representadas por uma estirpe padrão, além destas, foram incluídas na análise o maior número de estirpes possível. Neste sentido, estirpes de *Gigaspora* foram solicitadas de vários bancos de germoplasma e coleções particulares de pesquisadores. Foram obtidos, 51 acessos no total, representando 48 estirpes diferentes. Três acessos foram obtidos em duplicata (*Gi. gigantea* CUT; *Gi. margarita* BEG34; e *Gi. rosea* DAOM194757, ver Tabela 1). Estes acessos estavam sendo mantidos em laboratórios diferentes, e foram incluídos na análise para verificar se apresentavam variabilidade genética entre eles.

Foram incluídas também mais quatro estirpes, sendo três do gênero *Scutellospora* e uma do gênero *Glomus* (Tabela 1). Todas as estirpes utilizadas foram obtidas na forma de “solo inóculo” e foram caracterizadas como culturas puras através de análise morfológica pelos seus doadores. A única exceção foi à estirpe *Gi. gigantea* MN453A-7, obtida por intermédio do Dr. Chris Walker (Royal Botanic Garden Endinbourg), que recebeu o material do International Culture Collection of Arbuscular and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM <http://invam.caf.wvu.edu>) na forma de esporos dispersos em grãos de quartzo. Estes esporos estavam armazenados nesta condição desde 9 de outubro de 1997.

A possibilidade de caracterizar diretamente a diversidade de espécies da família *Gigasporaceae* em amostras de campo abre novas perspectivas para estudar a ecologia deste grupo de fungos sob condições naturais, sem que seja necessário o uso de culturas armadilha. Recentemente, *Gi. margarita* foi encontrada na Europa, e sua ocorrência parece estar relacionada com o sistema de cultivo utilizado para preparar o solo (JANSA et al., 2002). Além disso, algumas espécies de *Gigaspora* estabelecem simbiose com bactérias endossimbiontes obrigatórias pertencentes a um novo gênero recém proposto, *Glomeribacter gigasporanum* (BIANCIOOTTO et al., 2000, 2003), e a caracterização conjunta dos parceiros desta simbiose poderá facilitar a elucidação de aspectos ecológicos evolutivos destes organismos. PCR-DGGE desenvolvido para a região V9 do 18S rDNA é um método rápido e confiável para identificar espécies do gênero *Gigaspora* e determinar a diversidade de espécies de *Gigasporaceae* em condições de campo, bem como, para caracterizar o polimorfismo do rDNA entre e dentro de genomas de fungos MA.

Agradecimentos

Este projeto foi financiado pelo CNPq (projeto 200850/98-9, para F.A. de Souza) e pela Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ. O autor agradece aos pesquisadores que contribuíram enviando estirpes de fungos MA estudadas neste projeto: L. Abbott, G. Bécard, V. Bianciotto, D. D. Douds, V. Gianninazzi-Person (curador do European Bank of Glomeromycota), R. Herrera-Peraza, L. C. Maia, J. Morton (curador do INVAM), M. Saito, J. O. Siqueira, e C. Walker.

Referências Bibliográficas

AMANN, G.; STETTER, K. O.; LLOBET-BROSSA, E.; AMANN, R.; ANTON, J. Direct proof for the presence and expression of two 5% different 16S rRNA genes in individual cells of *Haloarcula marismortui*. **Extremophiles**, Tokyo, v. 4, p. 373-376, 2000.

clonagem e seleção de clones por PCR-DGGE. Esta estratégia permitiu estudar em detalhes o polimorfismo entre cópias do rDNA em um indivíduo (esporo). O conhecimento sobre esta variabilidade intra-genômica é fundamental para identificar com segurança unidades de taxonomia operacional para seqüências de DNA provenientes de estudos de ecologia e filogenia molecular (DAHLLOF et al., 2000). É possível que através de clonagem e seqüenciamento de clones específicos a diversidade de amostras ambientais seja sub-estimada se entre as espécies presentes existirem espécies que apresentem cópias idênticas, ou muito similares de rDNA, como é o caso das espécies de *Gigaspora* aqui estudadas. No entanto, é mais provável que a diversidade de espécies seja superestimada nestes estudos (SANDERS et al., 1995; DAHLLOF et al., 2000). Nossos resultados mostraram que algumas espécies de *Gigaspora* tem cópias do 18S rDNA que apresentam maior similaridade com cópias encontradas em outras espécies do que dentro do seu próprio genoma. Porém, para cada espécie foram encontradas também cópias “únicas” ou espécie-específicas. Dada a natureza assexuada dos fungos MA (KUHN et al., 2001), os mecanismos que geram e mantêm este polimorfismo no genoma dos fungos MA ainda tem que ser esclarecidos.

Embora, os genes ribossomais sejam empregados como marcadores moleculares em inúmeros estudos de filogenia de microrganismos, inclusive de *Gigaspora* (SCHÜßLER et al., 2001), dados obtidos apenas com esta família de genes não serão suficientes para resolver todos os problemas ou desafios filogenéticos e evolucionários destes organismos. A análise de outros genes ou marcadores moleculares são fundamentais para dar maior confiabilidade na reconstrução das relações filogenéticas neste gênero, bem como, entre os diferentes gêneros de fungos MA e entre níveis taxonômicos superiores. Assim, embora os resultados obtidos neste estudo, tenham demonstrado que é possível utilizar o polimorfismo intra-genômico das cópias do rDNA para detectar e identificar espécies dentro da família *Gigasporaceae*, estudos subseqüentes são necessários para explicar estes padrões e entender como eles se encaixam dentro do histórico de vida e evolução dos fungos MA.

Com o objetivo de testar a capacidade da técnica PCR-DGGE em discriminar espécies de *Gigaspora*, o curador do INVAM, Dr. Joe Morton, enviou entre as 13 estirpes de *Gi. rosea* uma amostra teste que teria sua identidade revelada após análise.

Amostras de solo

Amostras de solo foram obtidas da fazenda Agropecuária Lopes, situada em Santo Antônio, Estado de Goiás (16°28'00" de latitude Sul, 49°17'00" de longitude Oeste), a 823 m acima do nível do mar. As amostras foram coletadas de uma pastagem implantada a oito anos. A pastagem estava dominada por *Brachiaria decumbens*, que substituiu a vegetação de Cerrado nativa.

Amostras de solo indeformadas foram coletadas com cilindros de PVC (7,5 cm de diâmetro por 8,0 cm de profundidade). O solo, um Latossolo Vermelho Escuro (LVE), argiloso, apresentava pH em água (1:2,5) 5,5, e 0,0; 2,4; e 0,7 cmol_c.dm⁻³, respectivamente, para Al³⁺, Ca²⁺ e Mg²⁺ extraídos com solução 1 N de KCl, e 0,16 e 1,0 mg.dm⁻³, respectivamente, de P e K extraídos com Mehlich I. As amostras de solo foram transportadas para a Embrapa Agrobiologia, Seropédica, Estado do Rio de Janeiro, e utilizadas para estabelecer 10 culturas armadilha. Culturas armadilha têm a função de multiplicar os fungos MA, facilitando a análise morfológica dos esporos. Das 10 culturas estabelecidas, duas foram selecionadas para análise, uma contendo alto (Amostra A) e a outro baixo (Amostra B) número de esporos de *Gigaspora* (Tabela 2). A identificação e contagem dos esporos foram baseadas na análise morfológica, e os valores obtidos representam a média de três repetições. O procedimento para identificação morfológica de esporos está descrito por DE SOUZA et al. (1999). A identificação de esporos através de análise molecular foi feita utilizando trinta esporos de cada cultura armadilha.

Extração e preparação de esporos para análise de DNA

Esporos foram extraídos diretamente do material recebido das coleções de cultura através da técnica de peneiramento úmido, seguido de centrifugação em gradiente de sacarose (para maiores

detalhes ver DE SOUZA & BERBARA 1999). Após extração, procedeu-se à seleção cuidadosa dos esporos em lupa, seguido de limpeza dos esporos através de quatro seções de ultrassom (60W; B-2200 E1, Branson) com duração de 15 segundos cada, alternadas por lavagens com água ultrapura (Millipore). Após limpeza, foram selecionados esporos que apresentavam-se visualmente perfeitos e saudáveis e não continham marcas de parasitismo. Os esporos selecionados foram transferidos individualmente ou em grupos de 60 para microtubos plásticos e acondicionados a -80°C até análise. A análise de DNA extraído de várias amostras de um esporo foi utilizada para verificar a pureza dos inóculos recebidos e para comparar os resultados com o das extrações de DNA feitas a partir de múltiplos esporos.

Experimento teste de PCR para verificar a especificidade dos “primers” para a família *Gigasporaceae*

Com o propósito de avaliar o efeito da combinação de DNA de espécies alvo e não alvo, determinar o limite de detecção e a reprodutibilidade do padrão de bandas obtido pela técnica do PCR-DGGE, esporos das estirpes *Scutellospora heterogama* CNPAB2 e *Gi. margarita* CNPAB16 foram distribuídos nas proporções 1:1; 1:5; 1:10; 1:25; 1:50. e 1:100, e vice-versa, e o DNA extraído para análise. Para verificar o efeito de DNA de um fungo não alvo sobre a amplificação de DNA de *Gigasporaceae*, DNA foi extraído de combinações crescentes (até 1:100) de esporos de *Glomus clarum* CNPAB5 e *Gi. margarita* CNPAB16. Três amostras foram analisadas para cada combinação.

Experimento de casa-de-vegetação

Com o intuito de testar se a técnica do PCR-DGGE apresentava sensibilidade para detectar simultaneamente DNA extraído de múltiplas espécies de *Gigaspora* e *Scutellospora* que colonizam as raízes de uma mesma planta, foi conduzido experimento de casa-de-vegetação. Plantas de trevo (*Trifolium pratense*) foram inoculadas ou não com uma mistura de inóculo a base de solo contendo *Gi. margarita* CNPAB16, *S. gregaria* CNPAB7, *S. heterogama* CNPAB2, e *S. reticulata* CNPAB11. Para garantir a

sensibilidade deste método em diferenciar espécies filogeneticamente próximas de *Gigaspora*.

Outro resultado interessante foi o obtido com a estirpe *Gi. gigantea* UFLA872. Esta estirpe apresentou um perfil de bandas único por DGGE quando comparada com todas as outras estirpes analisadas (Figura 3). Além disso, a análise das seqüências de nucleotídeos confirma que esta estirpe apresenta uma seqüências do 18S rDNA não relatadas anteriormente para uma espécie de *Gigaspora*. É importante ressaltar que morfológicamente esta estirpe se assemelha muito a outras estirpes de *Gi. gigantea*. Por exemplo, ela apresenta a coloração típica no citoplasma que é considerado uma característica única da espécie *Gi. gigantea* (SEJALON-DELMAS et al., 1998).

Conflitos entre identificação de espécies de *Gigaspora* por meio da morfologia de esporos ou por caracterização molecular têm sido relatados em outros trabalhos. BAGO et al. (1998) sugeriu a re-classificação da estirpe DAOM194757, identificado com base na morfologia dos esporos como sendo *Gi. margarita*, para *Gi. rosea* com base na análise de seqüências de nucleotídeos. LANFRANCO et al. (2001) confirmaram este resultado e também sugeriram a re-classificação da estirpe E29 (*Gi. margarita* pela identificação morfológica) para *Gi. rosea*, com base na amplificação com “primers” espécie-específicos.

Implicações da heterogeneidade entre cópias do 18S rDNA em uma mesma espécie (genoma) para estudos de ecologia microbiana molecular e para estudos de genética evolutiva

A heterogeneidade ou polimorfismo entre cópias do rDNA dentro do genoma de uma espécie é um fenômeno que tem sido descrito em diversos organismos (NÜBEL et al., 1996; TANG et al., 1996; BUCKLER et al., 1997; AMANN et al., 2000; GANDOLFI et al., 2001). Através da aplicação do sistema PCR-DGGE utilizado neste estudo, foi possível não só utilizar este polimorfismo para caracterizar e identificar espécies, mas também desenvolver uma estratégia de avaliação do polimorfismo do rDNA que combinou

No entanto, os resultados obtidos com PCR-DGGE não dão suporte a esta reclassificação. Além disso, eles demonstram que as chamadas espécies-inválidas, ou sinônimas apresentam na verdade uma menor relação de similaridade com as supostas espécies sinônimas designadas pela análise morfológica do que com outras espécies. Através do PCR-DGGE foi possível, também, distinguir entre espécies filogeneticamente próximas e que foram agrupadas com base em assinaturas de nucleotídeos presentes na região V9 do 18S rDNA propostas por BAGO et al. (1998). A detecção de alto grau de polimorfismo entre cópias do rDNA em um genoma, na mesma região estudada por BAGO et al. (1998), demonstra que através do PCR-DGGE é possível explicar as ambigüidades encontradas nas assinaturas definidas por BAGO et al. (1998). Através do PCR-DGGE foi possível diferenciar entre as cópias do rDNA que ocorrem dentro de um mesmo genoma (Tabela 4), mas que no caso do seqüenciamento direto do produto do PCR, conforme feito por BAGO et al. (1998) produz ambigüidades em posições que apresentem heterogeneidade intra-genômica.

Nossos resultados sugerem que a estirpe identificada como *Gi. albida* INVAM927 seja re-classificada como *Gi. rosea* (Figura 3). Esta estirpe foi uma das estirpes utilizadas como material padrão por BENTIVENGA & MORTON (1995) para re-descrever as espécies de *Gigaspora* com base em caracteres morfológicos. No entanto, a estirpe utilizada em nossa análise veio do INVAM na Flórida e, não da Universidade da Virginia Ocidental, onde está localizada a atual coleção do INVAM. Infelizmente, não é possível fazer uma comparação entre os materiais examinados neste estudo e os utilizados por BENTIVENGA & MORTON (1995) por que este acesso foi perdido da coleção do INVAM (J.B. Morton, comunicação pessoal). A estirpe *Gi. albida* UFLA24 também deve ser re-classificada como sendo *Gi. ramisporophora*.

Entre as estirpes de *Gi. rosea* obtidas da coleção do INVAM, a estirpe BR235 era na verdade da espécie *Gi. albida*, enviada pelo curador do INVAM como uma amostra teste, para verificar a sensibilidade do sistema de PCR-DGGE desenvolvido neste estudo. Este isolado foi corretamente identificado através da análise por DGGE como sendo *Gi. albida* (Figura 3), resultado que demonstra a

nodulação das plantas de trevo, as plantas foram inoculadas também com um filtrado de solo contendo rizóbio coletado de plantas noduladas de trevo. As plantas foram crescidas em tubetes plásticos contendo 250 mL de uma mistura de solo e areia (1:1, v:v), apresentado pH 6.2 (relação solo:água 1:2,5). Os tubetes receberam fertilização esporádica com solução nutritiva (1/10 da força iônica HOAGLAND & ARNON 1950) sem fósforo e nitrogênio. Após um período de dois meses de crescimento, o conteúdo dos tubetes foi coletado para análise. O solo aderido as raízes foi removido cuidadosamente com auxílio de água corrente, em seguida o sistema radicular foi imerso em água previamente autoclavada e submetido a duas seções de ultrassom com duração de três minutos cada (60W; B-2200 E1, Branson), após cada seção o sistema radicular foi enxaguado com água autoclavada. O material obtido de raízes foi dividido em sub-amostras para análise de DNA e para avaliação da taxa de colonização radicular pelo método da intersecção de quadrantes (GIOVANNETTI & MOSSE 1980).

Extração de DNA de esporos, raízes e amostras de solo

Para extração de DNA de um único esporo, microtubos contendo esporos previamente preparados, foram removidos do congelador (-80°C), em cada tubo foi adicionado 40 µL de tampão 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, seguido de 10 µL de resina Chelex 100 (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, Estados Unidos da América) a 20% em água ultra-pura. O esporo foi quebrado vigorosamente com auxílio de um micro-pestilo (Treff AG, Degersheim, Suíça). Em seguida, os tubos foram incubados a 95°C por 10 minutos, rapidamente resfriados em gelo, e centrifugados a 10.000 x g por 2 minutos. O sobrenadante foi transferido cuidadosamente para um novo tubo e armazenado a -20°C até o momento da análise. Amostras contendo múltiplos esporos foram extraídas similarmente, com exceção de que foi utilizado 80µL de tampão e 40µL de resina Chelex 100 por amostra. Além disso, estas amostras foram tratadas com RNase antes de serem armazenadas.

Tabela 1. Espécies, código das estirpes, fonte ou pesquisador, origem geográfica e banco de germoplasma das espécies utilizadas neste trabalho^a

Nº	Espécie ^a	Código	Fonte/Pesquisador	Origem Geográfica	Banco de Germoplasma ^b
1	<i>Gigaspora albida</i> *	BR607A	J. Morton	Brazil	INVAM
2	<i>Gigaspora albida</i>	BR601	J. Morton	Brazil	INVAM
3	<i>Gigaspora albida</i>	UFLA24	J.O. Siqueira	Brazil	UFLA
4	<i>Gigaspora albida</i>	CL151	J. Morton	USA	INVAM
5	<i>Gigaspora albida</i>	FL713	J. Morton	USA	INVAM
6	<i>Gigaspora albida</i>	INVAM927	L. C. Maia	USA	CNPAB
7	<i>Gigaspora candida</i> *	BEG17	V. Gianninazzi-Person	Taiwan	BEG
8	<i>Gigaspora decipiens</i> *	AU102	J. Morton	Australia	INVAM
9	<i>Gigaspora decipiens</i>	W3516	L. Abbott/ C. Walker	Australia	Walker
10	<i>Gigaspora gigantea</i>	VA105C	J. Morton	USA	INVAM
11	<i>Gigaspora gigantea</i>	UFLA872	J.O. Siqueira	Brazil	UFLA
12	<i>Gigaspora gigantea</i> *	MN453A-7	C. Walker	USA	INVAM
13	<i>Gigaspora gigantea</i>	MA453A	J. Morton	USA	INVAM
14	<i>Gigaspora gigantea</i>	MN414D	J. Morton	USA	INVAM
15	<i>Gigaspora gigantea</i>	MN922A	J. Morton	USA	INVAM
16	<i>Gigaspora gigantea</i>	NC110A	J. Morton	USA	INVAM
17	<i>Gigaspora gigantea</i>	NC150	J. Morton	USA	INVAM
18	<i>Gigaspora gigantea</i>	CUT	D.D. Douds	USA	USDA-ARS
19	<i>Gigaspora gigantea</i>	CUT	G.Bécard	USA	CNRS
20	<i>Gigaspora margarita</i> *	WV205A	INVAM	USA	INVAM
21	<i>Gigaspora margarita</i>	CNPAB1	F. A. de Souza	Brazil	CNPAB
22	<i>Gigaspora margarita</i>	CNPAB16	F. A. de Souza	Brazil	CNPAB
23	<i>Gigaspora margarita</i>	BEG34 Fr	V. Gianninazzi-Person	New Zealand	BEG
24	<i>Gigaspora margarita</i>	BEG34 It	V. Bianciotto	New Zealand	Torino
25	<i>Gigaspora margarita</i>	IES32	R. HerreraPeraza	Cuba	IES
26	<i>Gigaspora margarita</i>	UFLA36	J.O.Siqueira	Brazil	UFLA
27	<i>Gigaspora margarita</i>	TARI SM 478	M. Saito	Taiwan	MAFF
28	<i>Gigaspora margarita</i>	K - 1 - 520052	M. Saito	Japan	MAFF
29	<i>Gigaspora margarita</i>	C - 520054	M. Saito	Japan	MAFF
30	<i>Gigaspora margarita</i>	Ni A	M. Saito	Nepal	MAFF
31	<i>Gigaspora ramisporophora</i> *	CNPAB22	F. A. de Souza	Brazil	CNPAB
32	<i>Gigaspora rosea</i> *	FL105	J. Morton	USA	INVAM
33	<i>Gigaspora rosea</i>	BR151A	J. Morton	Brazil	INVAM
34	<i>Gigaspora rosea</i>	BR227B	J. Morton	Brazil	INVAM

Os resultados obtidos com os isolados de diferentes localidades é muito interessante, principalmente, pelo fato de ter sido observado que em alguns casos a similaridade era maior entre isolados geograficamente mais distantes do que, isolados obtidos até de uma mesma área. Como exemplo, temos as espécies de *Gi. gigantea*, estirpes NC110A e NC150 que são culturas mono-espóricas obtidas do mesmo sítio experimental (BEVER et al., 2001) e que apresentaram perfis diferentes. Por outro lado, as estirpes CUT, MA453A e MN453A-7, apesar de terem sido isoladas de diferentes localidades, apresentaram perfis de bandas idênticos por DGGE. O mesmo resultado foi obtido entre as estirpes de *Gi. albida* BR601 do Brasil e o perfil tipo A da CL151 obtida nos Estados Unidos da América, os quais eram idênticos (Figura 3).

A presença de bandas específicas características a nível de isolados deve permitir o acompanhamento de populações específicas de fungos MA em estudos que visem elucidar o significado ecológico de populações simpátricas. Em alguns casos, foi verificada a ocorrência de diferenças na intensidade de bandas entre isolados geográficos de uma mesma espécie. Este resultado pode estar indicando que o número de cópias do rDNA pode ser diferentes entre isolados de uma mesma espécie. No entanto, métodos quantitativos, como a introdução de um padrão de concentração conhecida durante as reações para DGGE (10), são necessários para resolver esta questão.

Caracterização de espécies de *Gigaspora* por PCR-DGGE versus outros procedimentos aplicados previamente

A ausência de caracteres morfológicos discretos e diagnósticos para a identificação de espécies do gênero *Gigaspora* tem sido um dos principais obstáculos para a condução de estudos ecológicos neste grupo de fungos MA. A aplicação da técnica do PCR-DGGE como demonstrado neste trabalho oferece um melhor nível de discriminação entre espécies do que qualquer outro método já aplicado para o estudo deste gênero. Por exemplo, com base na morfologia de esporos, *Gi. candida* foi considerada sinônima da *Gi. rosea*, e a *Gi. ramisporophora* sinônima da *Gi. margarita* (BENTIVENGA & MORTON, 1995).

amplificação de DNA por PCR permita a detecção de cópias do rDNA de núcleos individualizados e posterior análise via DGGE.

Comparação entre os resultados obtidos com a amplificação de DNA obtido de um ou de múltiplos esporos e diversidade geográfica das estirpes analisadas

Os perfis de bandas de DGGE gerados pela amplificação de DNA extraído de um esporo, foram idênticos entres as repetições de 46 das 48 estirpes analisadas (Figura 3). Este resultado demonstra que, pelo menos para o nível de sensibilidade do sistema de PCR-DGGE utilizado neste projeto, a variabilidade genética entre as cópias do rDNA encontrada em um único esporo parece refletir a heterogeneidade encontrada em uma população de esporos da mesma estirpe. As duas exceções foram ambas culturas estabelecidas, possivelmente, com múltiplos esporos ou através de isolamento por cultura armadilha, não havendo informação de que estas culturas sejam mono-espóricas, ou seja, obtidas a partir de um único esporo. Culturas armadilha constituem a forma mais comum de isolamento de fungos MA de amostras de campo. No entanto, se mais de uma espécie morfológicamente similar for isolada simultaneamente na mesma cultura, a diferenciação posterior destas espécies com base na morfologia dos esporos pode ser difícil, principalmente entre espécies de *Gigaspora*, devido à sobreposição de caracteres morfológicos. A cultura *Gi. margarita* UFLA36, era composta por esporos que geraram dois perfis de bandas em DGGE bem distintos. Um tipo de perfil (UFLA36-T1) agrupou com espécies de *Gi. decipiens* e *Gi. margarita* (Figura 3), já o outro tipo de perfil (UFLA36-T2) agrupou junto com estirpes de *Gi. ramisporophora* e *Gi. rosea* (Figura 3). No caso da cultura *Gi. albida* CL151, os dois tipos de perfis gerados eram bem similares, sendo diferenciados apenas pela ausência de uma banda em um dos tipos de esporo e a intensidade relativa de uma das outras bandas (Figura 3). Nestas culturas, purificações adicionais através da obtenção de culturas mono-espóricas, seguido de identificação de esporos por PCR-DGGE poderia ser uma estratégia para purificar e diferenciar estas populações.

Tabela 1. Continuação.

Nº	Espécie ^a	Código	Fonte/Pesquisador	Origem Geográfica	Banco de Germoplasma ^b
35	<i>Gigaspora rosea</i>	BR235	J. Morton	Brazil	INVAM
36	<i>Gigaspora rosea</i>	FL219A	J. Morton	USA	INVAM
37	<i>Gigaspora rosea</i>	FL676	J. Morton	USA	INVAM
38	<i>Gigaspora rosea</i>	KS885	J. Morton	USA	INVAM
39	<i>Gigaspora rosea</i>	MA457C	J. Morton	USA	INVAM
40	<i>Gigaspora rosea</i>	NB103D	J. Morton	USA	INVAM
41	<i>Gigaspora rosea</i>	NC178	J. Morton	USA	INVAM
42	<i>Gigaspora rosea</i>	NY328A	J. Morton	USA	INVAM
43	<i>Gigaspora rosea</i>	UT102	J. Morton	USA	INVAM
44	<i>Gigaspora rosea</i>	WV187	J. Morton	USA	INVAM
45	<i>Gigaspora rosea</i>	BEG9	V. Gianninazzi-Person	Unknown	BEG
46	<i>Gigaspora rosea</i>	IES19	R. HerreraPeraza	Brazil	IES
47	<i>Gigaspora rosea</i>	CI – 520062	M. Saito	Japan	MAFF
48	<i>Gigaspora rosea</i>	INVAM185	D.D.Douds	USA	USDA-ARS
49	<i>Gigaspora rosea</i>	DAOM194757	D.D.Douds	Canada	USDA-ARS
50	<i>Gigaspora rosea</i>	DAOM194757	G.Bécard	Canada	CNRS
51	<i>Gigaspora</i> sp.	TW1-1	M. Saito	Taiwan	MAFF
52	<i>Scutellospora gregaria</i>	CNPAB7	F. A. de Souza	USA	CNPAB
53	<i>Scutellospora heterogama</i>	CNPAB2	F. A. de Souza	Brazil	CNPAB
54	<i>Scutellospora reticulata</i>	CNPAB11	F. A. de Souza	Brazil	CNPAB
55	<i>Glomus clarum</i>	CNPAB21	F. A. de Souza	Brazil	CNPAB

^a *, estirpe considerada padrão da espécies neste estudo.

^b BEG, European Bank of Glomeromycetes, Dijon, França; CNPAB, Embrapa Agrobiologia, Rio de Janeiro; CNRS, Centre National de la Recherche Scientifique, Toulouse, França; IES, Instituto de Ecología y Sistemática, Havana, Cuba; INVAM, International culture collection of arbuscular and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi, Morgantown, Estados Unidos da América; MAFF, Ministry of Agriculture, Forrest and Fisheries, Ibaraki, Japão; Torino, Dipartimento di Biologia Vegetale, Università di Torino, Tonna, Itália; UFLA, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais; USDA-ARS, U.S. Department of Agriculture-Agricultural Research Service; Walker C., coleção particular, New Milton, Inglaterra.

A extração de DNA das culturas armadilha, que continham amostra de solo, esporos e fragmentos de raízes foi feita com o kit comercial “UltraClean soil DNA isolation kit” de acordo com as instruções dos fabricantes (MoBio Laboratories, Solana Beach, Califórnia, Estados Unidos da América). Porém, antes da extração do DNA, as amostras (10g de solo e 2 g de raízes) foram homogeneizadas

através de trituração manual utilizando almofariz e pistilo de porcelana contendo nitrogênio líquido. Uma sub-amostra de 0,5 g de material de solo ou raiz foi utilizada para extração de DNA com o kit comercial. Após a extração, o DNA obtido tanto do material de solo como o de raiz foi submetido a uma purificação extra com o “Wizard DNA purification kit” (Promega) conforme descrição dos fabricantes. Para o experimento de casa-de-vegetação, o DNA das raízes das plantas foi extraído conforme o protocolo descrito por EDWARDS et al. (1997) utilizando 50 mg de raízes trituradas em nitrogênio líquido.

Tabela 2. Riqueza e número de esporos de fungos MA nas culturas armadilha obtidas de amostras de solo coletadas em pastagens de *Brachiaria decumbens* com oito anos de implantação na fazenda Agropecuária Lopes no Estado de Goiás.

Espécies	Amostra A	Amostra B
	Número de esporos. 30g ⁻¹ solo seco	
<i>Acaulospora mellea</i>	- ^a	8.3
<i>A. morrowiae</i>	23.3	-
<i>A. rehmsii</i>	8.3	19.0
<i>A. tuberculata</i>	1.7	36.7
<i>A. scrobiculata</i>	4.3	-
<i>Archaeospora gerdemannii</i>	95.3	-
<i>Gigaspora decipiens/margarita</i>	63.0	5.0
<i>Glomus macrocarpum</i>	57.3	2.3
<i>Glomus</i> N.1.	17.0	-
<i>Glomus</i> N.2.	128.0	28.0
<i>Glomus</i> N.3.	-	4.7
<i>Scutellospora coralloidea</i>	0.7	-
<i>S. heterogama</i>	1.3	-
Total	400.2	104.0

^a-, não encontrado.

(MYERS et al., 1987). Este tipo de resultado pode ser exemplificado pela análise da região V3-V4 do 18S rDNA, que apesar do fragmento amplificado ser mais longo (550 pb sem o grampo GC), ele contém um número menor de mutações entre as espécies de *Gigaspora* do que a região V9 do 18S rDNA. Por outro lado, esta região apresentou boa discriminação para espécies do gênero *Glomus* (KOWALCHUK et al., 2002).

Embora os perfis de banda analisados por DGGE tenham apresentado alta reprodutibilidade entre diferentes amostras de uma mesma estirpe analisada, a reprodução exata dos perfis depende das condições da eletroforese, da consistência na análise, e do emprego de estirpes padrão como marcadores. Estes são pontos importantes que não podem ser esquecidos quando se pretende comparar diferentes amostras e géis.

A similaridade entre as seqüências de DNA analisadas da região V9 do 18S rDNA foi alta em ambos os casos entre espécies e dentro das cópias presentes em uma mesma espécie (faixa de 98,6 a 100% de similaridade, Tabela 4). Das posições variáveis descritas na Tabela 4, somente 24 continham informação filogenética pelo critério da parsimônia. A alta similaridade entre as seqüências é um impedimento para uma análise filogenética robusta. Por outro lado, a comparação do perfil de bandas gerado pela análise do DGGE da região V9 do 18S rDNA provou ser um método de análise mais robusto para comparar a similaridade entre espécies do que através da construção de árvores filogenéticas baseadas nas seqüências de DNA descritas na Tabela 4. Através do desenvolvimento de “primers” adequados à técnica do PCR-DGGE e à amplificação de grupos taxonômicos de interesse, como os utilizados neste trabalho, é possível não só estudar a diversidade de espécies de fungos MA a campo, mas também estudar com maior profundidade aspectos relacionados a variabilidade genética nestes fungos. É importante ressaltar que as análises feitas neste trabalho empregando DNA extraído de um único esporo, não podem ser utilizadas para responder questões sobre a natureza homo ou heterocariótica dos núcleos nos fungos MA (20, GIANINAZZI-PEARSON et al., 2001; 54, TROUVELOT et al., 1999), embora, a sensibilidade da

amplificação de quase todo o gene do 18S mais as duas regiões intergênicas e o gene que codifica para o 5.8S (Figura 1). Após amplificação o produto de PCR gerado foi clonado, e em seguida uma segunda amplificação foi feita para selecionar os clones por PCR-DGGE com base na heterogeneidade presente na região V9 do 18S rDNA. Esta estratégia apresentou excelentes resultados no estudo da heterogeneidade do 18S rDNA que ocorre entre e dentro de espécies de *Gigaspora*. Os princípios desta estratégia podem ser aplicados para se estudar o polimorfismo em qualquer outro gene presente em fungos MA, ou outros organismos que apresentem elevado nível de polimorfismo interno entre seus genes. A aplicação deste procedimento em genes ou introns que apresentem rápida taxa de mutação poderá vir a possibilitar uma melhor discriminação entre isolados e também poderá ajudar a desvendar alguns questões evolutivas como o papel do “genetic drift” e das recombinações em fungos MA.

É importante destacar que o sistema de DGGE utilizado apresentou alta eficiência da detecção de mutações nas seqüências obtidas da região V9 do 18S rDNA. O fragmento analisado da região V9 do 18S rDNA apresentava 344 pb (sem o grampo de GC), sendo que destas 303 eram constantes, 24 e 17 eram, respectivamente, informativos ou não informativos para a análise de parsimônia (Tabela 4). O tamanho destes fragmentos está dentro da faixa ótima para análise através da técnica do DGGE, i.e. abaixo de 500 pb. A maioria das mutações encontradas foi do tipo transição (37 de 41), que permitem ótima separação por DGGE, porque elas sempre causam uma alteração na temperatura de abertura da dupla fita de DNA. No entanto, mutações do tipo transversão foram encontradas em quatro posições informativas para parsimônia (posições 274, 275, 279 e 299; ver Tabela 4). Algumas destas mutações não alteram a temperatura de abertura da dupla fita de DNA estudadas, conseqüentemente seqüências contendo estas mutações não seriam detectadas pela análise do DGGE, se estas fossem as únicas mutações presentes nas seqüências. Apesar do DGGE ter a capacidade de diferenciar a grande maioria dos tipos de mutações, o resultado da análise dependerá da quantidade e do tipo de mutação presente e do tamanho do fragmento de DNA amplificado

Amplificação de DNA de esporos utilizando um PCR em “nested”

O DNA de esporos foi amplificado inicialmente com o “primer” senso NS1 em combinação com o “primer” anti-senso ITS4, esta combinação de “primers” permite amplificar o DNA ribossomal (rDNA) do início do gene do 18S até o início do gene do 25S (ver esquema da Figura 1), cobrindo as duas regiões intergênicas e o gene do 5.8S (WHITE et al., 1990). Seqüências dos “primers” utilizados neste estudo, referências dos trabalhos onde foram desenvolvidos, e as condições do PCR utilizadas estão descritas na tabela 3, e a posição dos “primers” em relação ao rDNA pode ser vista na Figura 1.

Estas reações foram realizadas utilizando-se um volume de reagentes de 15 µL, sendo 5 µL do DNA molde. A mistura do PCR foi composta de 200 µM de cada um dos quatro deoxinucleosídeos trifosfato (dNTPs), 1,5 µM MgCl₂, 0,4 µM de cada primer, e uma unidade de polimerase “Expand High Fidelity” (Roche Diagnostics). O tampão de reação foi utilizado de acordo com as recomendações do fabricante. Todas as reações foram feitas em termocicladores PTC200 (MJ research).

O produto desta primeira amplificação foi diluído 1:1000 e 2 µL desta diluição foi utilizado como molde para uma segunda rodada de amplificações (nested), neste caso foi utilizado um volume final de reação de 25µL. As reações foram realizadas para amplificar a região V3-V4 ou a região V9 do 18S rDNA (ver Figura 1e tabela 3 para detalhes). Em cada uma destas amplificações um dos “primers” foi modificado para conter um grampo de GC que tem a função de estabilizar o comportamento de desnaturação da dupla fita de DNA durante a eletroforese em gel com agentes de desnaturantes do DGGE (SHEFFIELD et al., 1987).

PCR utilizando “primers” específicos para análise de comunidades de fungos MA da família *Gigasporaceae*

Com o intuito de obter produtos de PCR específicos para espécies da família *Gigasporaceae* a partir de DNA extraído de amostras de solo, raízes e esporos obtidos de culturas armadilha, e do

experimento de casa-de-vegetação, o primeiro ciclo de amplificações do PCR em “nested” combinou os “primers” senso FM6 (DE SOUZA et al., 2004) com o anti-senso GIGA5.8R (REDECKER 2000), (ver Fig. 1 e tabela 3 para detalhes). Para amplificação do DNA obtido de amostras de solo e raízes, foi necessário fazer diluições de 1:50 até 1:100 para serem utilizadas como DNA molde para PCR. As reações de amplificação foram preparadas conforme descrito acima, sendo utilizados 2 µL de DNA molde por reação. O produto do primeiro ciclo de amplificações foi diluído de 1:500 até 1:1000 vezes, dependendo da concentração do produto obtido, 2 µL das alíquotas diluídas foram utilizadas como DNA molde para o segundo ciclo de amplificações (“nested”). No segundo ciclo da amplificação foi utilizado o “primers” senso NS7 (White et al, 1990) contendo um grampo de GC em combinação com o anti-senso F1Ra (DE SOUZA et al., 2004), a reação foi feita utilizando as condições descritas anteriormente.

Análise de DGGE

As análises de DGGE foram realizadas no aparelho D-Gene (Bio-Rad), utilizando-se géis de 20 cm de comprimento, com gradientes de 25 a 40% e 32 a 42% de desnaturantes, respectivamente, para as seguintes combinações de “primers” e condições de corrida, “primers” NS31-GC/AM1, 75V por 16 horas, e “primers” NS7-GC/F1Ra, 95 V por 17 horas. A eletroforese foi feita em tampão 0,5 Tris-acetato-EDTA (TAE) a temperatura constante de 60°C. Após eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídio na concentração de 0,5 mg por litro, em seguida, os géis foram descorados em água MilliQ por dois intervalos de 15 minutos cada antes da exposição dos géis à luz ultravioleta e captura digital das imagens através do sistema ImaGo (B & L, Holanda).

Os perfis de bandas de DGGE obtidos foram comparados por análise de agrupamento utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard. A similaridade entre os perfis foi traduzida em um dendrograma construído com o método “unweighted pair group method with arithmetic average (UPGMA)” através do programa Bionumerics versão 2 (Applied Maths, Bélgica). Neste trabalho, o

resultados indicam que um volume total de esporos de 10% foi, em geral, necessário para garantir a detecção de populações minoritárias.

O sinal detectado pelo DGGE reflete o número relativo de moléculas de DNA alvo de uma dada espécie presente na amostra. Assim, mesmo assumindo eficiências iguais de amplificação, ainda é difícil traduzir o significado do sinal obtido por DGGE para certas espécies de fungos MA, porque a relação entre número de cópias de moléculas alvo do 18S rDNA e a biomassa fúngica e a importância ecológica desta relação não é conhecida até o momento. Além disso, como qualquer outra técnica baseada em PCR, a competição entre seqüências alvo é um problema que pode resultar na não detecção de espécies presentes em proporções muito baixas em relação a outras espécies também amplificadas pelo mesmo conjunto de “primers”. Este é um problema, que afeta não só os resultados obtidos com a técnica do PCR-DGGE, mas qualquer resultado gerado por PCR desenvolvido para amplificar alvos múltiplos, como é o caso de análise de comunidades microbianas. No entanto, como a detecção no DGGE necessita de uma quantidade de DNA que seja suficiente para formar uma banda visível nos géis de poliacrilamida, este problema parece ser mais grave nesta técnica do que, por exemplo, quando o produto do PCR é clonado e um número grande de clones é analisado por seqüenciamento, após seleção prévia por padrão de corte com enzimas de restrição. No caso do PCR-DGGE este problema pode ser superado através da análise de um maior número de amostras pequenas. Por exemplo, para análise de fungos MA colonizando as raízes de uma planta específica é melhor analisar diversos fragmentos de raízes do que analisar uma única amostra composta que representasse a diversidade de fungos colonizando a planta em estudo. No entanto, a análise de um número maior de amostras resultará em aumento de custo, tempo e trabalho necessário para obter os resultados. Esta relação custo-benefício deve estar equacionada com a pergunta científica que o pesquisador quer responder.

A segunda estratégia, empregou “primers” universais para eucariotos no primeiro ciclo de amplificações, que possibilitaram a

espécies é necessário utilizar o padrão completo das cópias do 18S rDNA presentes em cada espécie, em contraposição a utilização de seqüências isoladas, como, em geral, tem sido feito através da clonagem e seqüenciamento de um ou dois clones escolhidos ao acaso. Assim, em contraste com outros procedimentos moleculares, como PCR seguido de clonagem e seqüenciamento, no qual a interpretação da heterogeneidade entre as cópias do rDNA é dificultada devido a falta de conhecimento prévio sobre a extensão da variabilidade genética destes genes, a técnica do PCR-DGGE utiliza esta heterogeneidade como uma vantagem na geração de perfis altamente reproduzíveis, capazes de diferenciar espécies e até isolados. Além disso, em comparação com outros métodos moleculares o PCR-DGGE é mais rápido e barato para ser utilizado na identificação e caracterização de espécies.

Neste trabalho, foram utilizadas duas estratégias diferentes de PCR em “nested”. Na primeira estratégia, “primers” específicos para a família *Gigasporaceae* foram empregados no primeiro ciclo de amplificações por PCR. Esta estratégia possibilitou a análise de DNA extraído de amostras de campo e de pequenas quantidades de DNA extraído de esporos, solo e raízes, sem que houvesse problemas com amplificação não específica.

Conforme resultados apresentados, na amostra A da cultura armadilha (Tabela 2), havia a presença de esporos de espécies de *Gigaspora* e *Scutellospora*, ambos amplificados pelo conjunto de “primers” utilizados. Nestas amostras, a contagem de esporos foi feita em amostras de 30 gramas e foram encontrados em média menos de dois esporos de *Scutellospora*. Já a análise molecular foi feita com amostras de 0.5 gramas de solo ou raízes, e não foi detectada nenhuma *Scutellospora*, possivelmente devido a combinação destes dois fatores, tamanho reduzido da amostras e baixa frequência relativa de ocorrência de *Scutellospora* na amostra analisada. Já no experimento de casa-de-vegetação, os sinais moleculares para *Gigaspora* e *Scutellospora* foram detectados simultaneamente em raízes colonizadas de trevo (Figura 4). A estratégia do PCR-DGGE, possivelmente, irá falhar na detecção de populações minoritárias (i.e., <1% to total de moléculas alvo) (BRÜGGEMANN et al., 2000; MUYZER & SMALLA 1998), e nossos

perfil de bandas da estirpe *Gi. rosea* FL105 foi utilizado como referência para padronizar diferentes géis.

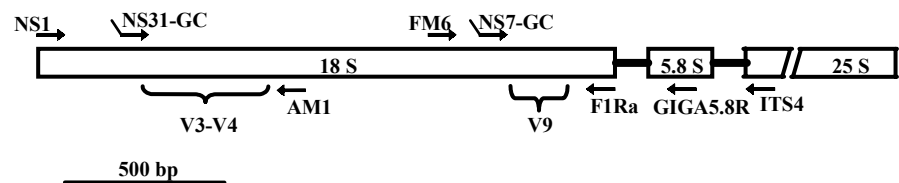


Figura 1. Representação esquemática do gene ribossomal (rDNA), focalizando no gene que codifica para o 18S. As posições aproximadas dos “primers” estão indicadas (setas), bem como, as regiões variáveis analisadas via PCR-DGGE (colchetes). Setas quebradas indicam “primers” contendo grampo de GC.

Tabela 3. “primers” para o rDNA, combinação de “primers”, grampo de GC e condições do PCR empregados neste trabalho^a

Primers ^a	Seqüência	Primer Reverso	Grupo Alvo	Condições para amplificação por PCR	Tamanho esperado ^c
NS1	5'-GTAGTCATATGCTTGCTCTC-3'	1TS4	Univ. Eucariotos	{94°C (60s), 55°C (240s)} x 30	2300
NS31-GC ^b	5'-TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC-3'	AM1	Univ. Eucariotos	{94°C (60s), 61°C (40s)} x 30	600
FM6	5'-ACCTGCTAAATAGTCAGGCTA-3'	GIGA5.8R	<i>Gigasporaceae</i>	{94°C (60s), 59°C (45s)} x 30	700
NS7-GC ^b	5'-GAGGCAATAACAGGTCTGTGATGC-3'	F1Ra	Univ. Eucariotos	{94°C (60s), 60°C (28s)} x 30	400
1TS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'		Univ. Eucariotos		-
AM1	5'-GTTTCCCGTAAGGCCCGAA-3'		Fungos		-
GIGA5.8R	5'-ACTGACCCCTCAAGCAKGTG-3'		<i>Gigasporaceae</i>		-
F1Ra	5'-CTTTTACTTCTCTAAATGACC-3'		Fungos		-

^a Referência para os Primer: NS1, NS7 e ITS4 - WHITE et al. (1990); NS31 - SIMON et al. (1992); AM1 - HELGASON et al. (1998); GIGA 5.8R - REDECKER (2000); FM6 e F1Ra - DE SOUZA et al. (2004).
^b grampo GC (5'- CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG -3') sintetizado após a porção 5' terminal dos “primers” NS31 e NS7.
^c Tamanho esperado em pares de base.

Teste de reprodutibilidade

Todas as amplificações de DNA por PCR e análises de DGGE foram feitas utilizando-se quatro extrações de DNA independentes feitas a partir de um esporo. Os resultados obtidos a partir da análise dos esporos isolados foram comparados com os resultados da amplificação de DNA obtido de múltiplos esporos. Este

procedimento foi realizado para detectar possíveis contaminações nos esporos (SCHÜßLER 1999) e para avaliar a reprodutibilidade do método, ou seja, a constância no perfil de bandas obtido. Para amostras de DNA obtidas de solo ou de raízes três sub-amostras foram comparadas para cada cultura armadilha ou repetição do experimento de casa-de-vegetação.

Seqüenciamento de DNA a partir da recuperação de DNA de bandas de géis de DGGE

Para avaliar a diversidade e identificar as seqüências de DNA obtidas a partir das análises das culturas armadilha, bandas com sinais mais fortes obtidas nas análises de DGGE foram retiradas dos géis e utilizadas em reações de seqüenciamento. Neste sentido, foi removida a porção mediana interna dos fragmentos selecionados, aproximadamente 60 mg de material do gel de poliacrilamida contendo o fragmento cortado. O pedaço do gel foi transferido para um microtubo com capacidade para 500 µL e em cada tubo foram adicionados 40 µL de água MilliQ. Em seguida, o tubo foi centrifugado rapidamente, para que o gel e a água ficassem no fundo do tubo. Após esta etapa os tubos foram congelados a -80°C por uma hora. Posteriormente, o gel ainda congelado foi fragmentado com o auxílio de um micropestilo (Treff AG), e os tubos foram incubados a 37°C por 3 horas, seguido de centrifugação a 11.000 x g por 60 segundos e transferência do sobrenadante para um novo tubo. Um µL deste sobrenadante foi utilizado como DNA molde para análises subseqüentes de PCR-DGGE visando confirmar a identidade da banda e sua pureza. Este procedimento foi repetido inúmeras vezes até que uma única banda nítida fosse obtida. Após esta fase de purificação, foi feita uma amplificação de PCR utilizando “primers” sem o grampo GC. O produto destas reações foi preparado para seqüenciamento (ver detalhes abaixo).

Clonagem do rDNA de fungos MA

Com o objetivo de obter clones para as diferentes variantes do rDNA que ocorrem em um único indivíduo (esporo), foram obtidos produtos de PCR a partir da amplificação de DNA obtido de um único esporo, utilizando a combinação de “primers” NS1 x ITS4

Discussão

PCR-DGGE como ferramenta para caracterização, identificação e detecção de espécies de *Gigaspora*

Através do emprego da técnica do PCR-DGGE aplicada à região V9 do 18S rDNA foi possível gerar perfis de bandas altamente reproduzíveis obtidos a partir da amplificação de DNA isolado de um esporo. O uso destes perfis possibilitou caracterizar e diferenciar, com base nas estirpes padrão utilizadas, todas as espécies de *Gigaspora*. Os resultados incluem a diferenciação de espécies previamente consideradas como não válidas, com base em parâmetros morfológicos (*Gi. candida* e *Gi. ramisporophora*, ver Figura 2). Além disso, para algumas espécies a variabilidade ou heterogeneidade intraespecífica entre as cópias do rDNA na região V9 do 18S rDNA, produziu marcadores moleculares adicionais, que possibilitam diferenciar algumas estirpes a nível de isolados, por exemplo, foi possível diferenciar, duas estirpes de *Gi. gigantea* (NC110A e NC150, ver Figura 3) que foram isoladas do mesmo sítio experimental. Estes marcadores específicos a nível de isolados mostraram, em geral, alta especificidade, e podem ser empregados na identificação específica destas estirpes em experimentos envolvendo competição ou em estudos de estabelecimento.

E o método do PCR-DGGE desenvolvido especialmente para detecção e identificação de espécies pertencentes à família *Gigasporaceae* representa uma opção mais precisa e rápida para caracterizar e identificar espécies de *Gigaspora* do que qualquer outro método aplicado até o momento para este gênero. Este estudo fornece a mais completa caracterização molecular disponível para o gênero *Gigaspora*.

Devido a maior similaridade entre as seqüências de algumas das cópias do rDNA presentes em espécies morfológicamente distintas, e a grande heterogeneidade interna entre as cópias destes genes dentro das espécies (ex. *Gi. albida*, *Gi. candida*, *Gi. ramisporophora*, e *Gi. rosea* ou entre *Gi. decipiens* e *Gi. margarita*; ver Figura 3 e Tabela 4), fica claro que para a distinção e caracterização destas

30 esporos extraídos da amostra A, por PCR-DGGE resultou em perfil de bandas similar ao perfil gerado pelas estirpes de *Gi. margarita* CNPAB1, CNPAB16 e IES32. Apesar das espécies do gênero *Scutellospora* serem detectadas pelo análise de PCR-DGGE utilizada, sinal molecular para este gênero, não foi encontrado nas amostras de DNA extraídas diretamente do solo ou de raízes. A análise molecular dos esporos de *Scutellospora* extraídos destas amostras possibilitou a diferenciação entre *Scutellospora* e *Gigaspora* (Figura 5). No entanto, a quantidade diminuta de material (0.5 g) de solo e raízes utilizados para extração de DNA e/ou a maior abundância relativa de esporos de *Gigaspora* em relação aos de *Scutellospora* nas amostras de solo e raízes analisadas, são possíveis explicações para a não detecção de *Scutellospora* nestas amostras.

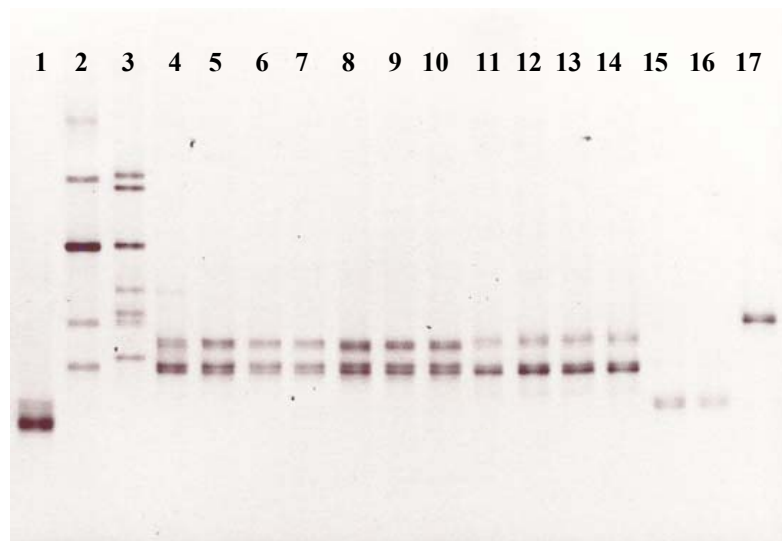


Figura 5: Identificação e detecção de espécies de Gigasporaceae, em amostras de DNA extraídas de solo, raízes e esporos das culturas armadilha, através de perfis de bandas de DNA obtidos pela análise de DGGE de fragmentos da região V9 do 18S rDNA. As corridas eletroforéticas foram feitas a 95V por 15 horas. Designação das linhas: 1. espora de *G. gigantea* UFLA; 2. espora de *G. gigantea* VA105C; 3. espora de *G. ramisporophora* CNPAB22; 4. espora de *G. margarita* CNPAB1; 5-7, solo da cultura armadilha A. 8-10, solo da cultura armadilha B. 11-14, Quatro esporos diferentes de *Gigaspora* obtidos da cultura armadilha A. 15-16: Dois esporos diferentes de *S. heterogama* extraídos da cultura armadilha A. 17: Espora de *S. coralloidea* extraído da cultura armadilha A.

conforme descrito anteriormente. Antes da clonagem os produtos dos PCRs foram purificados para eliminação dos “primers” e sais através de colunas – “High Pure PCR product purification kit” (Boehringer, Alemanha). Os produtos de PCR purificados foram clonados no vetor “pGEM-T easy”, e utilizados para transformação de *Escherichia coli* JM109 conforme recomendações do fabricante (Promega). As bactérias contendo insertos foram cultivadas, e os plasmídeos extraídos com o “Wizard Plus SV miniprep DNA purification system” (Promega), e o DNA plasmidial obtido foi utilizado, após diluição, como molde para ampliações de PCR e para reações de seqüenciamento.

Seleção de clones via PCR-DGGE e seqüenciamento de DNA

Com o objetivo de selecionar plasmídios, contendo insertos que representem as diferentes variantes do rDNA, com base no polimorfismo encontrado na região V9 do 18S rDNA, foram selecionadas bactérias contendo plasmídios com insertos obtidos a partir da clonagem de DNA extraído de um espora proveniente das estirpes padrões representantes das diferentes espécies de *Gigaspora*. As estirpes consideradas padrão estão assinaladas na Tabela 1. Além destas, foi analisada, também, a estirpe *Gi. gigantea* UFLA872, por apresentar um padrão de PCR-DGGE único.

Bactérias contendo um plasmídio com inserto de tamanho esperado foram utilizadas diretamente para amplificação por PCR através da técnica denominada PCR de colônia. Palitos de dente, previamente esterilizados em autoclave, foram utilizados para transferir uma quantidade diminuta de células de bactérias para microtubos contendo 25 µL de mistura para PCR. Para ter certeza que as células de bactérias iriam se soltar dos palitos de dente para a solução, os mesmos foram agitados vigorosamente dentro da solução para PCR. Após a adição das bactérias (molde) os microtubos foram transferidos para termocicladores e o produto das reações analisado, primeiro em gel de agarose e depois via DGGE.

A seleção de cópias de rDNA foi feita em DGGE, utilizando os “primers” NS7-GC em combinação com o F1Ra, seguindo os passos

descritos acima. Para auxiliar a seleção de clones que correspondessem ao das cópias encontradas nas estirpes originais, foram utilizados como padrão de referência (marcador) o perfil de bandas de DGGE obtido a partir da amplificação de DNA de esporos das estirpes empregadas na clonagem. Clones que apresentavam padrão eletroforético similar ao de bandas das estirpes padrão foram selecionados para seqüenciamento.

Antes de se proceder as reações de seqüenciamento o DNA dos plasmídios ou produtos de PCR foram passados por colunas de purificação Qiaquick (Qiagen). Reações de seqüenciamento foram feitas com o Big Dye terminator sequence reaction kit (Perkin Elmer, Califórnia, Estados Unidos da América) e as reações foram analisadas em um seqüenciador automático Perkin Elmer 3700.

Alinhamento de seqüências

Seqüências de DNA obtidas dos bancos de dados do GeneBank® ou EMBL ou geradas neste trabalho, foram alinhadas automaticamente pelo programa Clustal X (THOMPSON et al., 1997). Após o alinhamento automático, a qualidade do alinhamento foi melhorada manualmente. Em seguida, o alinhamento obtido foi submetido a análise filogenética utilizando o método de parsimônia através do programa PAUP* versão beta 10 (SWOFFORD 2003).

Número de acesso no EMBL das seqüências de nucleotídeos obtidas neste trabalho

As seqüências de DNA obtidas neste trabalho foram depositadas no EMBL com os números de acesso AJ539236 até AJ539305 e o alinhamento com o código ALIGN_000606.

Resultados

Perfis de DGGE obtidos da região V3-V4 do 18S rDNA

Todas as estirpes de *Gigaspora* testadas migraram para aproximadamente a mesma posição nos géis, estirpes das espécies *Gi. margarita*, *G. decipiens* e *Gigaspora* sp. TW-1 apresentaram

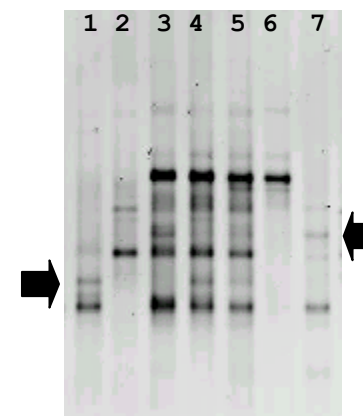


Figura 4. Identificação e detecção de espécies de Gigasporaceae de amostras de DNA extraídas de raízes de trevo com dois meses de crescimento. Perfis de bandas de DNA obtidos pela análise de DGGE de fragmentos da região V9 do 18S rDNA. Legenda das linhas: 1. *S. heterogama* CNPAB2; 2. *G. margarita* CNPAB16; 3. *Trifolium pratense* repetição 1; 4. *T. pratense* repetição 2; 5. *T. pratense* repetição 3; 6. *S. gregaria* CNPAB7; 7. *S. reticulata* CNPAB11. Setas indicam a ocorrência de bandas de DNA secundárias nos perfis obtidos para *S. heterogama* (linhas 4 e 5) e *S. reticulata* (linhas 3). As corridas eletroforéticas foram feitas a 95V por 17 horas.

3. Detecção de espécies da família Gigasporaceae em amostras de campo

Esporos de fungos MA foram extraídos das culturas armadilha obtidas com material de solo coletado em uma pastagem de *Brachiaria decumbens* estabelecida na região do Cerrado, e identificados com base nas características morfológicas (Tabela 2). Nas amostras foram encontrados esporos pertencentes a três gêneros (*Archaeospora*, *Acaulospora* e *Glomus*) que não são amplificados pelos “primers” para a família Gigasporaceae, e esporos dos gêneros *Gigaspora* e *Scutellospora* que são amplificados pelos “primers” utilizados. A análise empregando o PCR em “nested” e DGGE dos esporos de *Gigaspora* e raízes e solo obtido das culturas, resultaram em perfis de bandas similares ao padrão obtido para a estirpe padrão de *Gi. margarita* (Figura 5), sendo a similaridade comprovada através da análise das seqüências de DNA (Tabela 4). Além disso, a análise individual de

número de núcleos e de cópias do rDNA por núcleo, afetou consideravelmente a detecção da *S. heterogama*. DNA proveniente de um único esporo de *G. margarita* pode ser detectado em uma mistura com DNA de 100 esporos de *S. heterogama*, por outro lado, o sinal da *S. heterogama* não pode ser detectado quando esporos de *Gi. margarita* estavam em proporção superior a 5:1. Assim, a análise de amostras que apresentam grande variação na abundância relativa entre as espécies presentes pode resultar na não detecção de espécies com menor abundância. A análise de um maior número de amostras contendo esporos individualizados, ou pequenos grupos de esporos, bem como, a análise de fragmentos de raízes individualizados, são estratégias que podem ser empregadas para contornar o problema gerado pela competição durante amplificação por PCR.

2. Detecção de espécies da família *Gigasporaceae* em experimentos de casa-de-vegetação

No experimento conduzido em casa-de-vegetação, sob condições controladas, no qual plantas de trevo foram inoculadas simultaneamente com quatro espécies de *Gigasporaceae* sendo uma *Gigaspora* e três *Scutellospora*. Apesar do nível de colonização radicular das plantas estar abaixo de 20%, foi possível detectar o sinal molecular específico para *Gigasporaceae* através do PCR em “nested” e da análise via DGGE. As quatro espécies inoculadas foram detectadas (Figura 4). No entanto, a presença e a diferenciação entre duas espécies de *Scutellospora* (*S. heterogama* e *S. reticulata*), que apresentavam o mesmo padrão eletroforético para uma de suas bandas, foi obtida pela presença de mais uma banda no perfil de DGGE destas espécies (Figura 4), ou seja, através do polimorfismo entre cópias do rDNA.

bandas duplas bem próximas umas das outras, as outras estirpes apresentaram uma única banda.

A heterogeneidade inter e intraespecífica encontrada na região V3-V4 não foi suficiente para discriminar entre as espécies de *Gigaspora* testadas. Não obstante, foi possível separar as espécies em dois grupos: o primeiro grupo composto por *Gi. margarita*, *Gi. decipiens* e *Gigaspora* sp. TW-1 (todas com bandas duplas), e o segundo grupo composto por *Gi. albida*, *Gi. candida*, *Gi. gigantea*, *Gi. ramisporophora* e *Gi. rosea*, todas apresentando uma única banda de DNA no DGGE desta região.

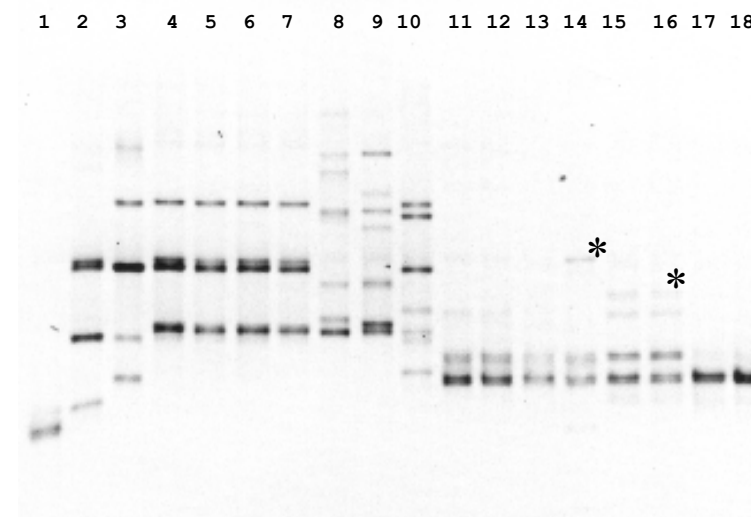


Figura 2: Perfil de bandas obtido pela análise de PCR-DGGE da região V9 do 18S rDNA de DNA amplificado de espécies de *Gigaspora*. Legenda das linhas: 1. *G. gigantea* UFLA; 2. *G. gigantea* MN43A-7; 3. *G. gigantea* VA105C; 4. *G. rosea* BEG9; 5. *G. rosea* FL105; 6. *G. rosea* IES19; 7. *G. albida* INVAM927; 8. *G. albida* BR607A; 9. *G. candida* BEG17; 10. *G. ramisporophora* CNPAB22; 11. *G. margarita* CNPAB1; 12. *G. margarita* CNPAB16; 13. *G. margarita* IES32; 14. *G. margarita* WV205A; 15. *G. margarita* BEG34 Fr; 16. *G. margarita* BEG34 It; 17. *G. decipiens* AU102; 18. *G. decipiens* W3516. Asterisco indica bandas de DNA específicas para este isolado de *G. margarita*.

Perfis de DGGE obtidos da região V9 do 18S rDNA

Através da análise de PCR-DGGE aplicada à região V9 do 18S rDNA, foi possível diferenciar todas as espécies de *Gigaspora*, com base nas estirpes padrão utilizadas (Figura 2), inclusive aquelas designadas, como sinônimas de outras espécies pela análise morfológica (*Gi. candida* e *Gi. ramisporophora*) de BENTIVENGA & MORTON (1995). Nesta região quase todos as estirpes analisadas apresentaram perfis com múltiplas bandas, indicando a ocorrência de variação intraespecífica (dentro do genoma) entre as cópias do 18S rDNA na região V9 (Figura 2). A consistência ou reprodutibilidade dos perfis obtidos para cada estirpe foi testada através da análise de DNA extraído de quatro esporos individualizados, bem como, de grupos de 60 esporos. Não foi encontrada nenhuma variação entre os perfis obtidos para as 48 estirpes testadas. As únicas exceções foram as estirpes *Gi. albida* CL151 e *Gi. margarita* UFLA36. O primeiro acesso produziu dois perfis muito similares (CL151a e CL151b, ver figura 3), porém no perfil CL151b, uma das bandas estava ausente e a banda mais baixa apresentava uma intensidade maior do que no perfil CL151a. O outro acesso produziu dois perfis de bandas muito diferentes um do outro (UFLA36-T1 e UFLA36-T2, ver Figura 3). Estas duas estirpes podem estar representando duas populações que foram isoladas simultaneamente (ver discussão). As culturas das três estirpes que estavam sendo mantidas em laboratórios diferentes apresentaram perfis idênticos.

Para determinar a consistência entre os perfis de bandas dentro de cada espécie e para verificar se a análise morfológica correspondia com a análise molecular foram comparados os perfis das 48 estirpes estudadas. A análise de agrupamento feita a partir dos perfis de bandas das 48 estirpes (ver dendrograma Figura 3) agrupou as estirpes em dois grupamentos principais, o primeiro grupo composto pelas espécies *G. albida*, *Gi. candida*, *Gi. ramisporophora*, *Gi. rosea* e a grande maioria das estirpes de *Gi. gigantea*. O segundo grupo composto pelas estirpes de *Gi. decipiens*, *Gi. margarita* e pela estirpe *Gigaspora* TW-1. Dentre as 10 estirpes de *Gi. gigantea* analisadas, uma, a estirpe UFLA872, apresentou um perfil único

Com relação à caracterização das espécies *Gi. candida* e *Gi. ramisporophora*, a análise das seqüências de DNA demonstrou que *Gi. candida* BEG17 apresenta similaridade com seqüências de *Gi. albida* BR607A, incluindo até uma assinatura de nucleotídeos, TAGGTT, não encontrada nas seqüências de *Gi. rosea*, que segundo BENTIVENGA & MORTON (1995) seria a espécie mais próxima morfológicamente da *Gi. candida*. Seqüências obtidas da *Gi. ramisporophora* CNPAB22 também apresentaram maior similaridade com seqüências de *Gi. albida*, *Gi. candida* e *Gi. rosea* do que com seqüências de *Gi. margarita*, apesar da aparente similaridade morfológica entre esporos de *Gi. ramisporophora* e *Gi. margarita*. Estes resultados não dão suporte a reclassificação, baseada na morfologia dos esporos, proposta por BENTIVENGA & MORTON (1995), na qual *Gi. candida* seria sinônima de *Gi. rosea* e, *Gi. ramisporophora* sinônima de *Gi. margarita*.

Detecção de espécies de *Gigasporaceae* em amostras de campo

1. Limite de detecção

Com o intuito de testar a especificidade do conjunto de “primers” para a família *Gigasporaceae*, DNA de *Glomus clarum* CNPAB5, foi utilizado como controle. A mistura de esporos de *Gl. clarum* e *Gi. margarita* não afetou a detecção nem o perfil de bandas de *Gi. margarita*, mesmo quanto os esporos de *Gl. clarum* apresentavam superioridade numérica de 100 para 1.

A detecção simultânea de diferentes espécies de *Gigaspora*, também não foi alterada, em combinações feitas em laboratório, nas quais o número de esporos de uma dada espécie não ultrapassava o de outra em 10% ou mais do total de esporos. A intensidade das bandas de DNA nos géis se relacionou grosseiramente com o volume dos esporos.

Nas combinações feitas com esporos de *S. heterogama* e *Gi. margarita*, espécies detectadas pelos “primers” para a família *Gigasporaceae*, em proporções variadas, o maior volume dos esporos da *Gi. margarita* que possivelmente reflete um maior

Tabela 4: Sequências de DNA de 70 clones de *Gigaspora* selecionados por PCR-DGGE e sequências de duas bandas extraídas de géis de DGGE, mostrando o alinhamento de 24 posições informativas pelo critério da parsimônia e duas posições não informativas da região V9 do 18S rDNA. Bases em negrito e sublinhadas indicam a localização das assinaturas de DNA propostas por BAGO et al. (1998).

Espécies, código dos clones ^{a,b} e das estirpes ^c	Posição no alinhamento ^{d,e}
<i>G. gigantea</i> A1* UFLA872; B1* UFLA872	0000111122222222222222233
<i>G. decipiens</i> 4; <i>G. margarita</i> M5, M6*, M7, CNPAB1; T2 CNPAB16; 7*, 8, 15* BEG34; DGGE b2	5777147936677777788889900
<i>G. margarita</i> F22, F44, CNPAB1; T3 CNPAB16	50164482456045689016792912
<i>G. margarita</i> M9 CNPAB1; T5 CNPAB16; DGGE b1	CCGCCCTATCGC CGCgtg CCCGTAC
<i>G. margarita</i> 1, 21 BEG34	CCGCCCTGTCGC CGAgtg GCTCGTAT
<i>G. decipiens</i> 2*; <i>G. margarita</i> 2, 10, 14 BEG34	CCGCCCTGTCGC CGAgtg GCTCGTAT
<i>G. decipiens</i> 9; <i>G. margarita</i> M18 CNPAB1; 5, 20 BEG34	CCGCCCTGTCGC CGAgtg GCTCGTAT
<i>G. margarita</i> M8* CNPAB1	CCGCCCTGTCGC CGAgtg GCTCGTAT
<i>G. albida</i> 13; <i>G. candida</i> C13, C17*; <i>G. ramisporophora</i> GP18	CCGCCCTGTCGC TAAgtg GCTCGCTT
<i>G. albida</i> 25*	CCGCCCTGTCGC TAAgtg GCTCGCTT
<i>G. ramisporophora</i> GP16-11; GP22	CCGCCCTGTCGC TAAgtg GCTCGCTT
<i>G. ramisporophora</i> GP27, GP49	CCGCCCTGTCGC TAAgtg GCTCGCTT
<i>G. rosea</i> genebank X58726	CCGCCCTGTCGC TAAgtg GCTCGCTT
<i>G. albida</i> 17; <i>G. candida</i> C4	CCGCCCTGTCGC TAAgtg GCTCGCTT
<i>G. rosea</i> R14, R16	CCGCCCTGTCGC TAAgtg GCTCGCTT
<i>G. ramisporophora</i> GP44	CCGCCCTGTCGC TAAgtg GCTCGCTT
<i>G. albida</i> genebank Z14009	CCGCCCTGTCGC TAAgtg GCTCGCTT
<i>G. ramisporophora</i> GP14	CCGCCCTGTCGC TAAgtg GCTCGCTT
<i>G. albida</i> 14; <i>G. candida</i> b4, C3, C12, C14b, C16	CCGCCCTGTCGC TAAgtg GCTCGCTT
<i>G. ramisporophora</i> 16-1, 16-2	CCGCCCTGTCGC TAAgtg GCTCGCTT
<i>G. ramisporophora</i> GP33; <i>G. rosea</i> E2, R13, R15	CCGCCCTGTCGC TAAgtg GCTCGCTT
<i>G. albida</i> 19*, 31; <i>G. candida</i> C1, C14, C18, G1	CCGCCCTGTCGC TAAgtg GCTCGCTT
<i>G. rosea</i> R19	CCGCCCTGTCGC TAAgtg GCTCGCTT
<i>G. gigantea</i> 15 VA105C	CCGCCCTGTCGC TAAgtg GCTCGCTT
<i>G. gigantea</i> 19 VA105C	CCGCCCTGTCGC TAAgtg GCTCGCTT
<i>G. gigantea</i> 3*, 7*, 26* VA105C	CCGCCCTGTCGC TAAgtg GCTCGCTT
<i>G. gigantea</i> 10 VA105C	CCGCCCTGTCGC TAAgtg GCTCGCTT
<i>G. gigantea</i> 6 VA105C	CCGCCCTGTCGC TAAgtg GCTCGCTT
<i>G. gigantea</i> 20*, genebank Z14010*	CCGCCCTGTCGC TAAgtg GCTCGCTT

(a) Clones com diferentes designações na mesma linha apresentam 100% de similaridade nas sequências de DNA com um ou mais clones na mesma linha;

(b) Código de clones na mesma linha seguidos por * apresentam menos de 100% de similaridade entre as sequências de DNA com outros clones na mesma linha;

(c) Código das estirpes não apresentados na tabela: *G. albida* BR607A; *G. candida* BEG17; *G. decipiens* W3516; *G. ramisporophora* CNPAB22; *G. rosea* BEG9.

(d) Posição 1 do alinhamento inicia na posição 5' terminal do primer NS7, de acordo com o alinhamento depositado no EMBL.

(e) Bases sombreadas em cinza ou preto indicam as bases mais divergentes entre as sequências estudadas. A grande maioria das mutações é do tipo transições (C-T or A-G). As bases GT em letras minúsculas não são filogeneticamente informativas, mas fazem parte das assinaturas de DNA propostas por BAGO et al., 1998.

(f) Sequências obtidas no Genebank®.

sem nenhuma banda em comum com nenhuma estirpe analisada (Figura 3).

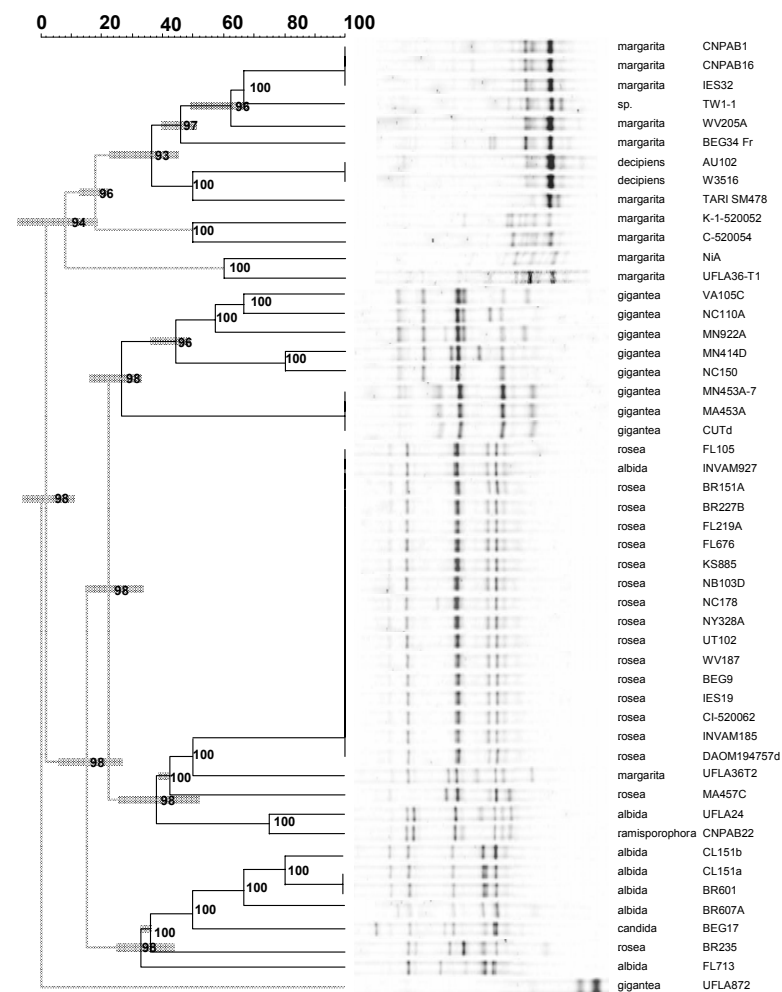


Figura 3. Dendrograma mostrando a similaridade (Jaccard - UPGMA) entre perfis de bandas de PCR-DGGE de 48 estirpes de *Gigaspora* e dois perfis divergentes encontrados em esporos das culturas das estirpes *Gi. albida* CL151 e *Gi. margarita* UFLA36. A escala indica a similaridade entre os perfis de bandas, e linhas tracejadas indicam separação entre os grupamentos principais, barra nos grupamentos indica faixa de erro. Números indicam o fator coafenético de correlação. As corridas eletroforéticas foram feitas a 95V por 17 horas.

Os perfis de bandas obtidos de estirpes identificadas morfológicamente como sendo da mesma espécie apresentaram, em geral, grande similaridade entre si (Figura 3). No entanto, na análise molecular, bandas específicas ao nível de isolado foram encontradas em diversas estirpes pertencentes a um mesmo tipo morfológico das espécies *Gi. albida*, *Gi. gigantea* e *Gi. margarita*, mas, em geral, não entre as estirpes identificadas como *Gi. decipiens* e *Gi. rosea* (Figura 3). Embora entre os acessos de *Gi. rosea*, a estirpe MA457C apresentou um número de bandas único no seu perfil de DGGE (Figura 3).

Através da análise via PCR-DGGE foram detectadas algumas identificações feitas com base na morfologia dos esporos que não correspondem com os padrões obtidos com as estirpes padrões, ou de referência para a espécie. Por exemplo, entre as estirpes de *Gi. albida*, o acesso UFLA24 agrupou junto com a estirpe padrão da espécie *Gi. ramisporophora* CNPAB22 e o acesso IVAM927 gerou um perfil de bandas idêntico a maioria das estirpes de *Gi. rosea*. Da mesma forma, a estirpe *Gi. rosea* BR235 agrupou junto com os isolados de *Gi. albida*. Esta estirpe foi identificada como sendo a estirpe teste enviada pelo curador do INVAM. Este resultado confirma a denominação incorreta deste acesso, sendo os resultados confirmados pelo Dr. J. B Morton curador do INVAM.

Embora as espécies *Gi. candida* e *Gi. ramisporophora* sejam ambas consideradas como sendo nomes de espécies inválidas com base nas características morfológicas feitas por BENTIVENGA & MORTON (1995), estas espécies foram claramente diferenciadas das outras espécies avaliadas pela análise via PCR-DGGE. Além disso, o perfil de bandas obtido para *Gi. candida* BEG17 apresentou maior similaridade com perfis obtidos pelas estirpes de *Gi. albida* do que para o de *Gi. rosea*, a qual seria a espécie mais próxima com base na análise morfológica. Da mesma forma, o perfil de bandas da *Gi. ramisporophora* apresentou maior similaridade com os de *Gi. rosea* do que com *Gi. margarita* (Figura 3), a espécie da qual BENTIVENGA & MORTON (1995) teriam indicado como sendo a sinônima com base na análise morfológica. No entanto, para uma caracterização molecular mais robusta das espécies *Gi. candida* e *Gi. ramisporophora* será necessário analisar um número maior de

acessos. Infelizmente, até o momento, pelo que sabemos, não existe outra estirpe de *Gi. candida* disponível em bancos de germoplasma. No caso da *Gi. ramisporophora* existem poucos isolados, bem caracterizados, disponíveis para esta espécie.

Análise das seqüências obtidas dos perfis de bandas do PCR-DGGE

Com o intuito de elucidar a natureza da heterogeneidade do rDNA entre e dentro das espécies de *Gigaspora* analisadas, ou seja, a natureza das múltiplas bandas de DNA obtidas por espécie, foram seqüenciados fragmentos de 344 pares de base, cobrindo a região V9 do 18S rDNA analisada pelo PCR-DGGE. As seqüências representam cada um dos tipos de rDNA encontrados nesta região, para as estirpes padrão analisadas (Tabela 4). A análise das seqüências confirmou a identidade das bandas de DNA que apresentavam a mesmo padrão de migração eletroforética no DGGE. Além disso, as seqüências e a análise filogenética, apresentada na forma de alinhamento, também confirmaram várias das relações obtidas pela análise de similaridade entre os perfis de bandas obtidos por PCR-DGGE (ver Figure 3 e tabela 4). Por exemplo, as análises confirmaram que *Gi. margarita* e *Gi. decipiens* são espécies próximas tanto no dendrograma (similaridade) como na análise das seqüências de DNA, e este grupo é distinto do grupo formado pelas espécies *Gi. albida*, *Gi. candida*, *Gi. ramisporophora* e *Gi. rosea*, e este, do grupo formado pela *Gi. gigantea*. Além disso, a estirpe *Gi. gigantea* UFLA872 que segundo a análise feita por PCR-DGGE é bem distinta das outras estirpes, contém também uma seqüência de nucleotídeos com uma assinatura, CGCGTG (Tabela 4), que está presente em algumas espécies de *Scutellospora* (BAGO et al., 1998).